

Aus der Abteilung für Klinische Pharmakologie

Direktor: Prof. Dr. med. Stefan Endres

Medizinische Klinik und Poliklinik IV

Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität München

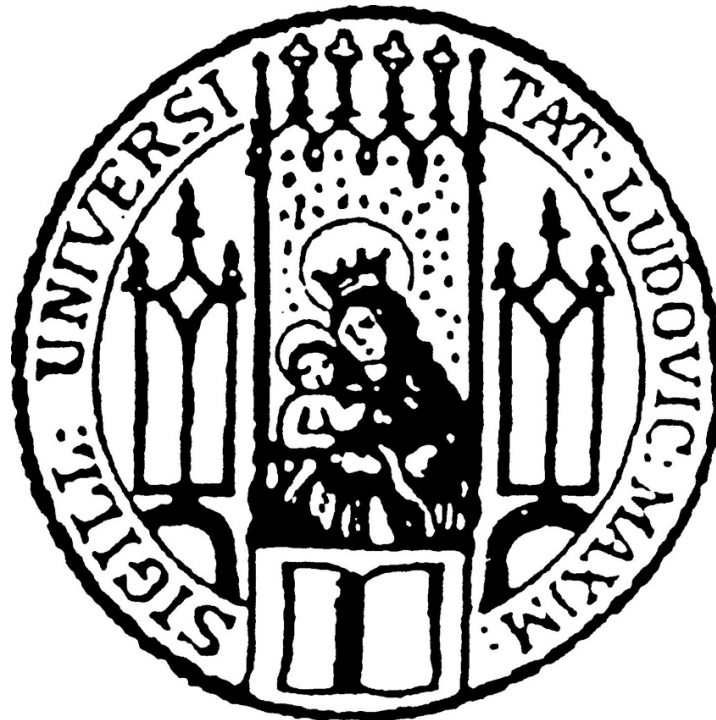
Direktor: Prof. Dr. med. Martin Reincke

**5'-Triphosphat-RNA induziert Tumorzelltod in einer RIG-I-abhängigen
priming-Phase und einer Oligoadenylatsynthetase 1 (OAS1)-RNase L-
abhängigen Effektorphase**

Dissertation zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität München



vorgelegt von

Daniel Böhmer

aus Wuppertal

2021

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichtersteller:	Prof. Dr. med. Maximilian Schnurr
Mitberichterstellerinnen:	Prof. Dr. med. Marion Subklewe
	Prof. Dr. med. Irmela Jeremias
	Prof. Dr. rer. nat. Kirsten Lauber
Mitbetreuung durch die promovierten Mitarbeiter:	Dr. rer. nat. Lars König
	PD Dr. rer. biol. hum. Peter Düwell
Dekan:	Prof. Dr. med. Thomas Gudermann
Tag der mündlichen Prüfung:	11.11.2021

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	4
1.1 Apoptose ist ein evolutionär konservierter Abwehrmechanismus gegen intrazelluläre Pathogene	4
1.1.1 Programmierter Zelltod: Essentieller Teil multizellulären Lebens	4
1.1.2 Apoptose als evolutionär konservierter Mechanismus der angeborenen Immunität	7
1.2 Mechanismen der Virusabwehr durch das angeborene Immunsystem	10
1.2.1 Prinzipien der Mustererkennung durch das angeborene Immunsystem	10
1.2.2 Immunrezeptoren für RNA: Toll- <i>like</i> -Rezeptoren und RIG-I- <i>like</i> -Rezeptoren	12
1.2.3 Interferon- <i>response</i> -Gene sind die Effektoren der angeborenen, antiviralen Immunantwort	14
1.2.4 RNA-Rezeptoren mit direkter antiviraler Wirkung	16
1.3 Zelltodinduktion durch Liganden von RIG-I- <i>like</i> -Helikasen	18
1.3.1 Molekulare Mechanismen der Zelltodinduktion durch Liganden von RIG-I- <i>like</i> -Helikasen	18
1.3.2 Immunologische Konsequenzen und Anwendung in der Immuntherapie von Tumoren	19
1.4 Fragestellung	21
2. Material und Methoden	24
2.1 Zellkultur und Zell-basierte Experimente	24
2.1.1 Zelllinien und Kulturbedingungen	24
2.1.2 Transfektion mit Liganden von RIG-I- <i>like</i> Rezeptoren und Infektion mit <i>Vesicular Stomatitis Indiana Virus</i>	24
2.1.4 CRISPR Cas9-vermittelter Knockout von Genen	26
2.1.5 Messung der Induktion von Apoptose und Interferon-stimulierten Genen in Einzel- und Kokulturen mittels Durchflusszytometrie	28
2.1.6 Viabilitätsbestimmung mittels <i>Cell Titer Blue Assay</i>	29
2.1.7 Quantifizierung von IFN- β und CXCL10 (IP-10) im Zellkulturüberstand.	29

2.1.8 Inhibitoren und blockierende Antikörper	29
2.2 Molekularbiologische Methoden	30
2.2.1 Isolation und Analyse der Intaktheit zellulärer RNA.....	30
2.2.2 RNA-Sequenzierung	30
2.2.2.1 Durchführung	30
2.2.2.2 Bioinformatische Analyse.....	30
2.2.3 <i>Western</i> Blot	31
2.2.4 Affinitätsreinigung von 3p-RNA und Massenspektrometrie	32
2.2.4.1 Affinitätsreinigung	32
2.2.4.2 Probenvorbereitung für die Massenspektrometrie	32
2.2.4.3 Liquid-Chromatographie-Massenspektrometrie/ Massenspektrometrie-Analyse	33
2.2.4.4 Datenanalyse und markierungsfreie Quantifizierung	34
2.3 Quantifizierung und statistische Analyse	35
3. Ergebnisse	36
3.1 RIG-I-Liganden lösen Tumorzelltod durch einen RIG-I-unabhängigen, IFN-I-abhängigen Mechanismus aus.....	36
3.1.1 Die Induktion von Zytokinen und Zelltod durch 3p-RNA ist von einem intakten RIG-I-Signalweg abhängig	36
3.1.2 Die Zelltodinduktion durch 3p-RNA besteht aus einer IFN-I-abhängigen <i>priming</i> - und einer RIG-I-unabhängigen Effektorphase	37
3.1.3 IRF3 ist essentiell für die <i>priming</i> -Phase der Zelltodinduktion durch 3p-RNA	40
3.1.4 Die Exekution von Zelltod durch das <i>Vesicular Stomatitis Indiana Virus</i> ist unabhängig von RIG-I	41
3.1.5 3p-RNA löst intrinsische Apoptose aus	43
3.2 3p-RNA führt zur Aktivierung des OAS1/RNase L-Signalweges	45
3.2.1 Die Veränderung der Genexpression RIG-I-defizienter Zellen durch Stimulation mit 3p-RNA ist von einer Vorstimulation mit IFN-I abhängig.....	45
3.2.2 Proteine aus der Familie der RNA-Rezeptoren mit direkter	

antiviraler Wirkung werden durch IFN-I hochreguliert	46
3.2.3 Die Induktion von Zelltod durch 3p-RNA ist abhängig von der 5'-Triphosphat-Gruppe und unabhängig von <i>hairpin</i> - oder instabilen Sekundärstrukturen	47
3.2.3 3p-RNA bindet spezifisch OAS1 und aktiviert RNase L	50
3.2.4 Die Aktivität von RNase L vermittelt Zelltod durch 3p-RNA.....	52
4. Diskussion	54
4.1 Zusammenfassung der experimentellen Ergebnisse und Folgedaten	54
4.2 Die Zelltodinduktion durch 3p-RNA erfolgt in einem zweistufigen Prozess.	57
4.2.1 Die <i>priming</i> -Phase von 3p-RNA-abhängigem Zelltod wird durch RIG-I über IFN-I vermittelt	57
4.2.2 RNase L als Effektor von RNA-induziertem Zelltod	59
4.3 3p-RNA als neuartiger Ligand von OAS1	61
4.4 Translationale Implikationen für Viruserkrankungen und die Immuntherapie von Tumoren mit RIG-I-Liganden	63
4.4.1 Potentielle Bedeutung für Viruserkrankungen am Beispiel von COVID-19	63
4.4.2 Anwendung in der Immuntherapie von Tumoren.....	64
5. Zusammenfassung	67
6. Literaturverzeichnis	68
7. Verzeichnis der Abkürzungen und Akronyme	78
8. Danksagung	82
9. Affidavit	83
10. Wissenschaftliche Beiträge	84
10.1 Originalarbeiten	84
10.2 Übersichtsarbeit (<i>Perspective</i>).....	84
10.3 Abstracts und Poster (nur Erstautorenschaften).....	84

1. Einleitung

1.1 Apoptose ist ein evolutionär konservierter Abwehrmechanismus gegen intrazelluläre Pathogene

1.1.1 Programmierter Zelltod: Essentieller Teil multizellulären Lebens

Der Tod einzelner Zellen ist ein elementarer Bestandteil für die Entwicklung und Homöostase vielzelliger Mechanismen sowie für deren Immunabwehr, indem er einzelne, infizierte Wirtszellen eliminiert und die Replikation des Pathogens verhindert. Fehlregulierter Zelltod jedoch ist an zahlreichen Krankheitsprozessen des Menschen beteiligt. Zu viel Zelltod führt zu Organschäden bei vielen akuten (z.B. Myokardinfarkt, Schlaganfall) oder degenerativen Erkrankungen (z.B. Diabetes mellitus, Neurodegeneration) (Degterev & Yuan, 2008). Zu wenig Zelltod führt zu Autoimmunerkrankungen (über verminderten Tod von T-Zellen bei der negativen Selektion autoreaktiver Klone im Thymus) und Krebs (verminderter programmierter Tumorzelltod). Die präzise Regulation von Prozessen, die Zelltod auslösen, ist somit für jeden Organismus entscheidend.

Im Folgenden soll auf die Entdeckung des programmierten Zelltodes und die Mechanismen der intrinsischen Apoptose näher eingegangen werden. Hierauf sollen Hypothesen zur Evolution des programmierten Zelltodes in Zusammenhang mit der angeborenen Immunabwehr vorgestellt werden.

Zelltod wurde das erste Mal vor über 150 Jahren festgestellt. Jedoch dauerte es weitere 120 Jahre bis dieser als molekular definiertes, zelluläres Programm wahrgenommen wurde (Strasser & Vaux, 2018). Seither konnten diverse Mechanismen des programmierten Zelltodes molekular- und zellbiologisch charakterisiert werden.

Die ersten Beschreibungen von Zelltod erfolgten auf der Basis morphologischer Beobachtungen und unterschieden vorrangig zwei Zelltodformen: Nekrose und Apoptose. Während Nekrose über viele Jahrzehnte vor allem als „akzidentelle“ Zelltodform, die durch extremen physikochemischen Stress ausgelöst wird, betrachtet wurde, wurde Apoptose schon früh als definiertes Programm wahrgenommen (Kerr *et al.*, 1972; Kerr, 2002). Die morphologischen Charakteristika der Apoptose beinhalten: Zellschrumpfung, Verdichtung (Pyknose) und Zerfall des Zellkerns (Karyorrhexis) sowie die Formation apoptotischer Körperchen (*apoptotic bodies*) bei einer lange intakten Zellmembran (Elmore, 2007). Inzwischen jedoch ist klar, dass es eine ganze Reihe

weiterer molekular regulierter Zelltodprogramme unter anderem auch Formen der regulierten Nekrose (Nekroptose, Pyroptose) gibt, denen essentielle physiologische Relevanz zukommt (Galluzzi *et al.*, 2018).

In den 1990er Jahren konnten die grundlegenden molekularen Mechanismen der Apoptose geklärt werden (Hengartner, 2000). Ein zentrales biochemisches Kennzeichen der Apoptose ist die Aktivierung sogenannter Caspasen. Hierbei handelt es sich um Cystein-abhängige Proteasen, die Peptide und Proteine an einer Peptidbindung direkt nach einem Aspartat hydrolysieren. Sie lassen sich nach ihrer Rolle in der Signaltransduktion in Initiator- und Exekutionscaspasen sowie nach dem Zelltodmodus, an dem sie beteiligt sind, in apoptotische und inflammatorische Caspasen einteilen.

Apoptose lässt sich anhand der beteiligten Initiatorcaspasen in extrinsische und intrinsische Apoptose einteilen. Während extrinsische Apoptose vor allem nach Aktivierung von Rezeptoren aus der Tumor Nekrose Faktor (TNF)-Rezeptorfamilie über die Caspasen 8 und 10 ausgelöst wird, wird intrinsische Apoptose über die Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran (*mitochondrial outer membrane permeabilization*, MOMP) und die darauffolgende Aktivierung der Caspase 9 definiert (Galluzzi *et al.*, 2012). Verschiedene intrazelluläre Stresssignale wie z.B. DNA-Schaden, oxidativer Stress oder Akkumulation von fehlgefalteten Proteinen im endoplasmatischen Retikulum (ER) werden durch die Zelle wahrgenommen und über Proteine der *B-cell lymphoma 2* (BCL2)-Familie in eine pro- bzw. anti-apoptotische Balance an der äußeren Mitochondrienmembran integriert (Abbildung 1). Die Familie der BCL2-Proteine kann in pro- und anti-apoptotische Proteine eingeteilt werden: Die Proteine *Bcl-2-associated X protein* (BAX), *Bcl-2 homologous antagonist/killer* (BAK) und *Bcl-2-related ovarian killer* (BOK) konstituieren eine Gruppe von proapoptotischen Proteinen, die in der Lage sind, Poren in der äußeren Mitochondrienmembran zu bilden, wenn sie nicht durch die antiapoptotischen BCL2-Proteine wie z.B. BCL2 selbst, *Bcl-2-like protein 1* (Bcl-xL) oder *induced myeloid leukemia cell differentiation protein Mcl-1* (MCL-1) inhibiert werden. Die pro-apoptotischen BH3-only Proteine (z.B. *Bcl-2-like protein 11* (BIM), *BH3 interacting-domain death agonist* (BID), *phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1* (PMA-induced protein 1 oder Noxa), *p53-upregulated modulator of apoptosis* (PUMA)) vermitteln ihre Wirkung vorrangig durch direkte Interaktion/Inhibition der antiapoptotischen BCL-2 Proteine (Youle & Strasser, 2008). Die MOMP führt zur Freisetzung von Cytochrom C in das Zytosol. Hierauf kommt es zur Aktivierung von *apoptotic protease activating factor-1* (APAF1) und Bildung des „Apoptosoms“ mit autokatalytischer Aktivierung der Caspase 9 über *induced proximity* und Dimerisierung

(Ramirez & Salvesen, 2018). Die aktive Form der Caspase 9 katalysiert die proteolytische Aktivierung der Effektorcaspasen 3 und 7 (Van Opdenbosch & Lamkanfi, 2019). Die enzymatische Aktivität dieser Effektorcaspasen ist verantwortlich für die typische Morphologie dieses Zelltodprozesses (Ramirez & Salvesen, 2018).

Es mehrte sich jedoch die Evidenz, dass die Aktivierung der Caspasen-Kaskade weniger ein essentieller Schritt in der Auslösung des Zelltodes, als vielmehr ein wichtiger, regulierender Prozess in der Exekution von Apoptose ist. Tatsächlich scheint der *point-of-no-return* in der Auslösung intrinsischer Apoptose die MOMP und nicht die Aktivierung von Caspasen zu sein (Tait & Green, 2008; Tait *et al.*, 2014). Vielmehr ist die Aktivität von Caspasen essentiell, um eine überschießende Immunreaktion durch Apoptose zu verhindern. Nach Auslösung von Apoptose in der Abwesenheit von Caspasen-Aktivität kommt es sowohl zur Induktion von Typ-I Interferonen (IFN-I) über den *cyclic GMP-AMP synthase* (cGAS)/*stimulator of interferon genes* (STING) Signalweg durch die Erkennung mitochondrialer DNA als auch von *nuclear factor kappa B* (NF- κ B)-abhängigen proinflammatorischen Zytokinen (Rongvaux *et al.*, 2014; White *et al.*, 2014; Giampazolias *et al.*, 2017; Ning *et al.*, 2019). Das unterstreicht wie eng verwoben die Mechanismen des programmierten Zelltodes und der angeborenen Immunantwort sind. Dies ergibt sich nicht zuletzt aus ihrer vermutlich gemeinsamen Evolution, auf die im Folgenden näher eingegangen werden soll.

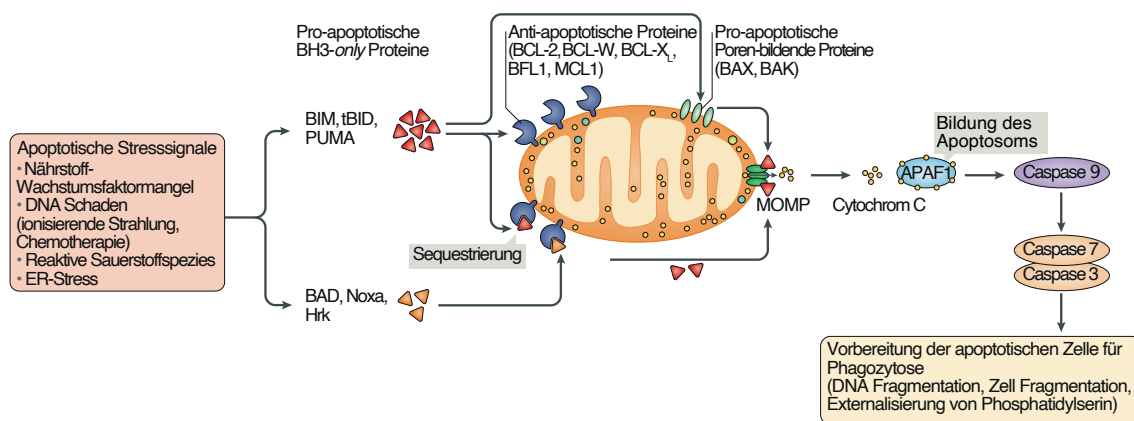


Abbildung 1 Intrinsische Apoptose (vereinfacht aus Singh *et al.*, 2019)

Apoptotische Stresssignale führen über die Hochregulation pro-apoptotischer BH3-only Proteine zur Inhibition/Sequestrierung anti-apoptotischer BCL-2 Proteine bzw. fördern direkt die Porenbildung durch BAX und BAK. Durch die MOMP kommt es zur Freisetzung von Cytochrom C in das Zytosol und Bildung des Apoptosoms. Durch die Initiatorcaspase 9 erfolgt die Aktivierung der Caspasen Kaskade und die Vorbereitung der apoptotischen Zelle für Phagozytose.

1.1.2 Apoptose als evolutionär konservierter Mechanismus der angeborenen Immunität

Formen programmierten Zelltodes können in Pflanzen (Coll *et al.*, 2011), Hefen (Strich, 2015), Protozoen (Reece *et al.*, 2011) bis hin zu Bakterien (Engelberg-Kulka *et al.*, 2006) nachgewiesen werden. Apoptose jedoch (definiert als Aktivierung von Caspasen), scheint es nur in Metazoen (vielzelligen Tieren) zu geben (Green & Fitzgerald, 2016).

Innerhalb der Metazoen hingegen scheint Apoptose ein Prozess zu sein, der sich aus einem frühen gemeinsamen Vorläufer entwickelt hat:

Apoptose kann bereits in Schwämmen, Mollusken, Arthropoden und Würmern nachgewiesen werden (Strasser & Vaux, 2018). Cytochrom C ist eines der am stärksten konservierten Gene (Green & Fitzgerald, 2016). Die Überexpression von humanem BCL2 hat sogar in *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) eine antiapoptotische Wirkung (Vaux *et al.*, 1992) und die BH3-only Proteine fungieren auch in *C. elegans* als pro-apoptotische Proteine, die den Zelltod *upstream* von BCL2 Proteinen regulieren (Conradt & Horvitz, 1998).

Ob dieser Gemeinsamkeiten entwickelten Douglas Green und Patrick Fitzgerald die Hypothese, dass die Entwicklung von Apoptose in einem einzelligen, gemeinsamen Vorläufer der Eukaryoten stattfand (Green & Fitzgerald, 2016): In Archaea müsste es hierfür bereits intrazelluläre Rezeptoren für bakterielle Produkte, u.a. für (Holo-)Cytochrom C, gegeben haben, die Zelltod nach Infektion mit einem Bakterium auslösen. Im Rahmen der Endosymbiose würde die Expression bakterieller/proto-mitochondrialer Proteine, die ursprünglich zur Porenbildung in Membranen der Wirtszelle, um diese wieder zu verlassen, dienten, zu Cytochrom C-Freisetzung und somit zum Tod der Wirtszelle führen. Diese Toxine (i.e. proto-BCL2 Proteine) wären daraufhin in das Genom des Wirtes übergegangen, was die Symbiose weiter erzwungen hat.

Es gibt jedoch einen fundamentalen Unterschied in der Aktivierung der Caspasen-Kaskade in Säugetieren im Vergleich zu wirbellosen Tieren wie Nematoden: In Säugetieren ist der entscheidende Schritt die MOMP durch BAX/BAK, für die es bei Nematoden keine Homologe gibt. In Nematoden ist die direkte Aktivierung von Caspase 9/APAF1-Homologen durch BCL2 Homologe der entscheidende Schritt zur Initiation von Apoptose. Strasser und Vaux prägten hierzu die Hypothese, dass es ein Original BCL2-*like* Protein gegeben haben muss, das wie BAX oder BAK in der Lage war Poren in der äußeren Mitochondrienmembran zu bilden. Über Mechanismen der Duplikation und Mutation entstanden daraus die BCL2 und BH3-*only* Proteine, die wir heute kennen (Strasser & Vaux, 2018).

Diesen Ideen zur Evolution von programmiertem Zelltod und Apoptose liegt ein zentraler Gedanke zu Grunde: Apoptose war initial vor allem ein Abwehrsystem (Vaux *et al.*, 1994). Sollte es Formen von Apoptose – wie oben postuliert – bereits in einzelligen Organismen gegeben haben, war es wahrscheinlich sogar ihre ursprüngliche Funktion. Obwohl es zunächst nicht intuitiv erscheint, gibt es eine evolutionäre Rationale für Entwicklung von programmiertem Zelltod in einzelligen Organismen: Eine Zelle, die umgeben von ihren genetisch identischen Klonen durch ein Bakterium infiziert wird, bewahrt mit höherer Wahrscheinlichkeit ihre eigene genetische Information, wenn sie zum Schutz ihrer Klone vor einer sich ausbreitenden Infektion Suizid begeht. Programmierter Zelltod für Homöostase und Entwicklung wäre demnach eine evolutionär spätere „Umnutzung“ der bereits für die Immunabwehr vorhandenen Mechanismen.

Diese Hypothese wird von einer Reihe weiterer Beobachtungen gestützt (Strasser & Vaux, 2018):

- Mit den inflammatorischen Caspasen 1, 4, 5 und 11 gibt es eine Gruppe von Caspasen, deren zentrale Funktion neben der Auslösung von Pyroptose die Aktivierung der pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 und IL-18 und damit die Immunabwehr ist (Broz & Dixit, 2016).
- Viele Viren tragen die genetische Information für anti-apoptotische Genprodukte (z.B. BCL2-Homologe (Vaux *et al.*, 1994)), die den Tod der erfolgreich infizierten Zelle verhindern. Dies muss ihnen einen evolutionären Vorteil – mutmaßlich die erfolgreiche Replikation innerhalb der Wirtszelle – verschafft haben. Umgekehrt bedeutet das, dass programmierter Zelltod ein wichtiger Abwehrmechanismus der angeborenen Immunität von Metazoen ist.
- Die Entwicklung von *C. elegans* wird durch den Funktionsverlust von CED-3 (verwandt zu Caspase 1 in Säugetieren) oder CED-4 (Homolog zu APAF-1) nicht eingeschränkt (Ellis & Horvitz, 1986), jedoch zeigt sich hierdurch eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber einer Infektion mit *S. typhimurium* (Aballay & Ausubel, 2001).

Es soll hier nicht unerwähnt bleiben, dass es auch Hypothesen gibt, die den Ursprung der molekularen Grundlagen der Apoptose in anderen biologischen Prozessen als der Immunabwehr vermuten. Eine prominente Theorie nimmt einen gemeinsamen Ursprung von Zelldifferenzierung und Apoptose vor dem Hintergrund der eng verwandten molekularen Prozesse an (Bell & Megeney, 2017).

Interessant ist, dass in der vielleicht ursprünglichsten Form des programmierten Zelltodes, der Pyroptose, ein zweistufiger Prozess, der aus einer *priming*- und einer Effektorphase besteht, zum zentralen Dogma zählt. In diesem Zelltodprozess ist die Erkennung eines *pathogen-associated molecular pattern* (PAMP) (z.B. Lipopolysaccharid, LPS, alternativ auch *microbe-associated molecular pattern*, MAMP genannt) immer der erste Schritt der *priming*-Phase. Typischerweise erfolgt die Erkennung des PAMP dabei durch einen klassischen *pattern recognition receptor* (PRR) wie z.B. Toll-*like* Rezeptor 4 (TLR4), der durch transkriptionelle Induktion der zweiten Rezeptorfamilie und der Vorstufen der pro-inflammatorischen Zytokine pro-IL1 β und pro-IL-18 die Auslösung des Effektorschrittes vorbereitet (*priming*-Phase). Die Auslösung der Zelltodkaskade wird durch einen zweiten Sensor ausgelöst, der seine Wirkung weniger durch Änderung der Genexpression als vielmehr durch direkte post-translationale Effekte wie zum Beispiel die Aktivierung von Caspase 1 durch NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 3 (NLRP3) vermittelt (Effektorphase). Somit hängt die Auslösung des Zelltodes nicht nur von der Aktivierung einer einzigen, sondern von zwei unterschiedlichen Rezeptorfamilien ab. Die Bedeutung dieses zweistufigen Mechanismus in der Auslösung von Apoptose, um eine überschießende oder unnötige Auslösung von Zelltod zu vermeiden, erscheint umso sinnvoller, wenn es ähnliche Prozesse bereits in einzelligen Organismen gegeben haben sollte. In der vorliegenden Arbeit erfolgt die erstmalige Beschreibung eines vergleichbaren, zweistufigen Prozesses in der antiviralen Apoptoseinduktion durch Liganden des zentralen, antiviralen PRR *retinoic acid-inducible gene 1* (RIG-I) in Tumorzellen.

1.2 Mechanismen der Virusabwehr durch das angeborene Immunsystem

1.2.1 Prinzipien der Mustererkennung durch das angeborene Immunsystem

Das Immunsystem wird in einen adaptiven und einen angeborenen Teil unterschieden. Die adaptive Immunität kann über Mechanismen der genetischen Rekombination und klonalen Selektion in T- und B-Zellen Antigen-spezifische Immunantworten auslösen. Das angeborene Immunsystem erfüllt die Funktion eine schnelle, relativ unspezifische Immunantwort gegen eindringende Pathogene auszulösen und somit die adaptive Immunantwort vorzubereiten. Dies erfolgt durch die Erkennung von PAMPs bzw. MAMPs und *danger-associated molecular patterns* (DAMPs) durch PRRs. MAMPs haben entweder eine molekulare Struktur, die sie eindeutig von körpereigenen Molekülen unterscheidet (z.B. LPS als Bestandteil der bakteriellen Zellwand), oder sie treten in einem zellulären Kompartiment auf, in dem sie unter physiologischen Bedingungen nicht vorhanden sind (z.B. lange doppelsträngige Ribonukleinsäure (RNA) im Zytoplasma) (Medzhitov, 2007).

Die Erkennung von Viren durch das angeborene Immunsystem stellt besondere Anforderungen an die Diskriminierung von selbst gegen fremd. Da Viren zur Replikation die wirtseigenen Strukturen nutzen, sind insbesondere virale Proteine für die einzelne Wirtszelle nahezu unmöglich als fremd zu erkennen. Hinzu kommt, dass Viren durch enormes evolutionäres Potenzial leicht Evasionsstrategien für genetisch kodierte MAMPs entwickeln. Nicht zuletzt aus diesen Gründen erfolgt die Erkennung von Viren durch das angeborene Immunsystem nahezu ausschließlich durch Detektion viraler Nukleinsäuren (Barbalat *et al.*, 2011). Nachdem Nukleinsäuren selbstverständlich auch endogenen Ursprungs sein können, sind es vor allem bestimmte biochemische Charakteristika, die die Erkennung einer Nukleinsäure durch das angeborene Immunsystem erlauben. Für Desoxyribonukleinsäure (DNA) außerhalb des Nukleus sind das vorrangig lange doppelsträngige, AT-reiche oder CpG-reiche, unmethylierte Sequenzen, lange einzelsträngige DNA, die Sekundärstrukturen bildet, sowie DNA-RNA-Hybride. Virale RNA wird vor allem dann als fremd erkannt, wenn sie besonders lang (> 30 Basenpaare (bp)) und doppelsträngig ist, am 5' Ende ohne *capping* ein Tri- oder Diphosphat aufweisen oder als einzelsträngiges Molekül Sekundärstrukturen bildet (Schlee & Hartmann, 2016). Zudem spielt die Kompartiment-Spezifität bei der Erkennung von Nukleinsäuren eine herausragende Rolle.

Die in Eukaryoten zur Erkennung fremder Nukleinsäuren relevanten Rezeptoren lassen sich in zwei Kategorien unterteilen: Einerseits klassische Immunrezeptoren (PRRs), die durch die Aktivierung antiviraler Signaltransduktion zur Ausschüttung von Chemokinen und Zytokinen, darunter den zentralen IFN-I, und damit u.a. zur Attraktion und Aktivierung von Immunzellen führen, wie z.B. RIG-I (Hartmann, 2017). Andererseits RNA-Rezeptoren, die direkt die virale Replikation und Propagation über Aktivierung Zell-intrinsischer Mechanismen wie Translationsarrest oder Apoptose verhindern, wie z.B. *double-stranded RNA-activated protein kinase R* (PKR). IFN-I, induziert durch PRRs und essentiell für die Hochregulation der zweiten Gruppe von RNA-Rezeptoren, verbinden beide Mechanismen der RNA-Erkennung innerhalb der Zelle. Im Folgenden sollen diese drei zentralen Aspekte der RNA-Erkennung genauer beleuchtet werden: Erkennung viraler RNA durch PRRs, Ausschüttung von IFN-I und Induktion von Interferon-stimulierten Genen (ISGs), sowie Erkennung viraler RNAs durch RNA-Rezeptoren mit direkter antiviraler Wirkung. Eine Übersicht hierzu gibt Abbildung 2.

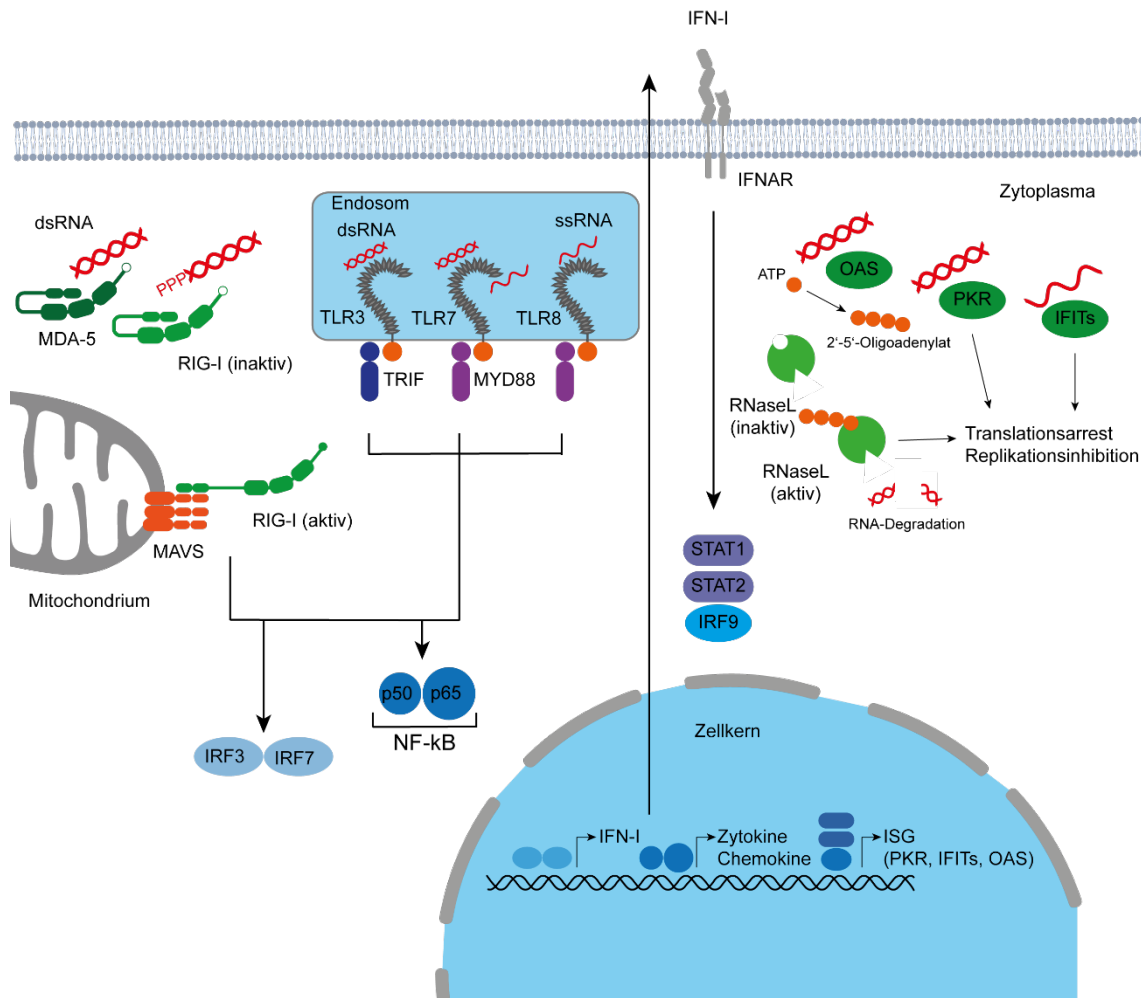


Abbildung 2 RNA-Rezeptoren (nach Schlee und Hartmann (Schlee & Hartmann, 2016))

RNA viralen Ursprungs wird im Endolysosom durch TLR3, 7 und 8 sowie im Zytosol durch die RLRs RIG-I und MDA5 erkannt. Hierdurch kommt es nach Interaktion mit den entsprechenden Adapterproteinen (TRIF, MYD88, TASL (nicht dargestellt) und MAVS zur Induktion von IFN-I und pro-inflammatorischen Zytokinen über die Transkriptionsfaktoren IRF3/-7 und NF-κB. IFN-I wiederum induzieren über den Transkriptionsfaktorkomplex ISGF3 (bestehend aus STAT1, STAT2 und IRF9) ISGs, worunter sich die Gruppe der RNA-Rezeptoren mit direkter antiviraler Wirkung befindet. Diese Gruppe von Rezeptoren vermittelt ihre Wirkung durch direkte Interaktion mit der viralen RNA u.a. durch Translationsarrest und damit Inhibition der Virusreplikation.

1.2.2 Immunrezeptoren für RNA: Toll-*like*-Rezeptoren und RIG-I-*like*-Rezeptoren

Immunrezeptoren für virale RNA können in die hauptsächlich im Endolysosom lokalisierten TLR 3, 7 und 8 und die zytosolisch lokalisierten RIG-I-*like*-Rezeptoren (RLRs) unterteilt werden. Zu den RLRs zählen RIG-I, *melanoma differentiation-associated protein 5* (MDA5) und *laboratory of genetics and physiology 2* (LGP2).

TLR7 und 8 werden durch die Bindung an einzelsträngige RNA-Moleküle bzw. kurze doppelsträngige RNA (nur TLR7) aktiviert (Wu & Chen, 2014). TLR8 erkennt einzelsträngige RNA, nachdem sie durch endosomal lokalisierte Endoribonukleasen (vorrangig RNase T2) geschnitten wurde (Greulich *et al.*, 2019; Ostendorf *et al.*, 2020).

TLR7 und TLR8 homodimerisieren nach Erkennung von RNA und es kommt zur Bildung des sogenannten „Myddosome“, einem *supramolecular organizing center* (SMOC), bestehend aus dem Adapterprotein *myeloid differentiation primary response 88* (MYD88) sowie *interleukin-1 receptor-associated kinase* (IRAK)1, IRAK2 und IRAK4. Das Myddosome rekrutiert hierauf *TNF receptor associated factor* (TRAF)6 und *mitogen-activated protein kinase kinase kinase 7* (MAP3K7 oder TAK1), wodurch der zentrale Transkriptionsfaktor des *mitogen-activated protein kinase* (MAPK)-Signalweges (AP1) und NF- κ B aktiviert und damit pro-inflammatorische Zytokine induziert werden (Liu & Gack, 2020). Die Induktion von IFN-I durch TLR7 und 8 scheint hingegen von dem erst kürzlich identifizierten Adapterprotein *TLR adaptor interacting with SLC15A4 on the lysosome* (TASL) abzuhängen, das über ein pLxIS Motiv (p: Aminosäure mit hydrophilem Rest, x: Aminosäure mit beliebigem Rest) mit IRF5 interagiert und zu dessen Aktivierung führt (Heinz *et al.*, 2020). TLR7 wird beinahe exklusiv auf B-Zellen und plasmazytoiden dendritischen Zellen, TLR8 präferentiell auf Immunzellen aus dem myeloiden Kompartiment exprimiert (Hartmann, 2017). Sie spielen demnach in der Zytokininduktion nach Stimulation mit immunstimulatorischen RNAs von Tumorzellen aus soliden Tumoren in aller Regel keine Rolle.

TLR3 erkennt doppelsträngige RNA ab einer Länge von ca. 40-50 bp, die nach Bindung an die Ektodomäne zu einer Homodimerisierung von TLR3 und damit zur Aktivierung der Signalkaskade führt (Leonard *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2008). TLR3 wird typischerweise von Makrophagen und verschiedenen Subtypen von dendritischen Zellen im Endolysosom, jedoch auch auf der Zelloberfläche von Fibroblasten und einigen Tumorzelllinien exprimiert (Schlee & Hartmann, 2016). Im Gegensatz zu allen anderen bekannten TLRs ist das Adapterprotein für TLR3 nicht MYD88, sondern *TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β* (TRIF) (Yamamoto *et al.*, 2003; Oshiumi *et al.*, 2011). TRIF aktiviert über TRAF3-TANK-binding kinase 1 (TBK1)- *inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit epsilon* (IKK ϵ) den Transkriptionsfaktor IRF3 und über TRAF6-receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1 (RIPK1)-TAK1 die Transkriptionsfaktoren der NF- κ B- und MAPK-Signalwege (Liu & Gack, 2020), wodurch es wiederum zur Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen und IFN-I kommt.

Die wichtigsten zytoplasmatisch lokalisierten Rezeptoren für RNA viralen Ursprungs sind RIG-I und MDA5 aus der Gruppe der RLRs. Zu dieser Gruppe zählt zudem das Protein LGP2. Alle RLRs besitzen eine C-terminale Domäne (CTD) und eine Helikase-Domäne, die ihre Bindung an virale RNA vermitteln. RIG-I und MDA5 verfügen zudem über eine N-terminale *tandem caspase activation and recruitment domain* (2CARD)-Domäne, über die sie mit der CARD-Domäne des hauptsächlich mitochondrial lokalisierten Adapterproteins *mitochondrial antiviral signaling protein* (MAVS) interagieren und die Aktivierung des Signalweges vermitteln (Hur, 2019). RIG-I erkennt vorrangig kurze doppelsträngige RNA (> 19 bp) mit einem 5'-Tri- oder Diphosphat (Hornung *et al.*, 2006; Schlee *et al.*, 2009; Schmidt *et al.*, 2009; Goubau *et al.*, 2014), während MDA5 vorrangig lange doppelsträngige RNA mit Sekundärstrukturen erkennt (Kato *et al.*, 2008; Pichlmair *et al.*, 2009; Feng *et al.*, 2012), wobei insbesondere für MDA5 der *in vivo* Ligand während viraler Infektionen weiterhin Gegenstand der Forschung ist.

Nach Bindung des Liganden durch RIG-I oder MDA5 kommt es zu einer Konformationsänderung, die eine intermolekulare Interaktion der 2CARD-Domäne ermöglicht. Hierauf bildet die 2CARD-Domäne ein Homotetramer und nach Interaktion mit der CARD-Domäne von MAVS entstehen MAVS-Oligomere, sogenannte Filamente (Cadena und Hur, 2019). Diese MAVS-Filamente stellen – analog zu den Adapterproteinen der TLR-Familie (TRIF, MYD88, TASL) – die Basis für das SMOC zur Aktivierung der weiteren Signalkaskade dar (Kagan *et al.*, 2014). Nach der MAVS Oligomerisierung kommt es zur Rekrutierung von TRAF2, TRAF6, IKK und TBK1 und hierdurch über die Transkriptionsfaktoren NF- κ B und IRF3 bzw. IRF7 zur Induktion von proinflammatorischen Zytokinen und IFN-I (Bartok & Hartmann, 2020).

1.2.3 Interferon-*response*-Gene sind die Effektoren der angeborenen, antiviralen Immunantwort

Interferone sind essentieller Bestandteil der Virusabwehr in Wirbeltieren (Secombes & Zou, 2017). Alle Interferone führen zur Aktivierung von Januskinase (JAK)/*signal transducer and activator of transcription* (STAT) Signalwegen und damit zur Induktion von Genen, die essentiell für die antivirale und -tumorale Immunabwehr sind, den ISGs. Sie lassen sich in Abhängigkeit von dem Rezeptor, den sie aktivieren, in Typ-I, -II und -III Interferone unterteilen.

IFN-I sind die zentralen Zytokine der angeborenen, antiviralen Immunantwort. Ihre Ausschüttung erfolgt nach Aktivierung diverser PRRs wie TLRs und RLRs. IFN-I setzen

sich aus IFN- α , IFN- β , IFN- ϵ , IFN- κ and IFN- ω zusammen (Chow & Gale, 2015). Alle IFN-I vermitteln ihre Wirkung über den nahezu ubiquitär exprimierten *interferon alpha/beta receptor* (IFNAR), der ein Heterodimer aus den Proteinen IFNAR1 und IFNAR2 darstellt. Nach Bindung an den IFNAR kommt es zur Aktivierung der Tyrosinkinasen JAK1 und *tyrosine kinase 2* (TYK2), die zur Phosphorylierung und damit Aktivierung von STAT1 und STAT2 führen. STAT1 und STAT2 dimerisieren und rekrutieren nach Translokation in den Nukleus IRF9 und bilden somit den Transkriptionsfaktorkomplex *IFN-gene stimulated factor 3* (ISGF3). Dieser Transkriptionsfaktorkomplex bindet *IFN-stimulated response elements* (ISREs) auf der DNA und aktiviert damit die Transkription der ISGs (Ivashkiv & Donlin, 2014). Zudem kommt es nach Aktivierung des IFNAR auch zur Bildung von phosphorylierten STAT1-Homodimeren, die nach Translokation in den Nukleus IFN- γ -*activated site* (GAS)-Elemente binden und die Transkription dieser Gene induzieren.

IFN- γ ist das einzige Typ-II Interferon (IFN-II) und wird primär von Immunzellen, insbesondere von aktivierten T-Zellen und NK-Zellen, sezerniert. Der IFN- γ Rezeptor (IFNGR) wird analog zum IFNAR aus einem Heterodimer aus IFNGR1 und IFNGR2 gebildet und ist auf fast allen kernhaltigen Zellen exprimiert (Chow & Gale, 2015). Nach der Bindung von IFN- γ an den IFNGR kommt es zur Aktivierung der Rezeptor-assoziierten Tyrosinkinasen JAK1 und JAK2, die wiederum STAT1 phosphorylieren. Nach der Phosphorylierung von STAT1 kommt es zu dessen Homodimerisierung und Translokation in den Nukleus, wo es wiederum GAS-Elemente bindet und die Transkription von ISGs, die über ein GAS-Element verfügen, induziert (Platanias, 2005). Der Transkriptionsfaktorkomplex ISGF3 wird über den IFNGR Signalweg nicht gebildet und somit kommt es hier nicht zur Induktion von Genen, die nur über ein ISGF3 nicht jedoch über ein GAS-Element verfügen.

Typ-III Interferone (IFN-III, bestehend aus IFN- λ 1/IL-29, IFN- λ 2/IL-28a, IFN- λ 3/IL-28b und IFN- λ 4) unterscheiden sich von IFN-I und IFN-II vor allem darin, dass ihr Rezeptor – ein Heterodimer aus IFNLR1 und IL-10R2 – vor allem auf Zellen epithelialen Ursprungs exprimiert wird. Sie spielen demnach eine wichtige Rolle in der Pathogenabwehr an Schleimhäuten oder der Blut-Hirn-Schranke (Sommereyns *et al.*, 2008). IFN-III benutzen ebenso den ISGF3 Transkriptionsfaktorkomplex und führen somit zur Induktion von ähnlichen ISGs wie IFN-I (Chow & Gale, 2015).

ISGs vermitteln die antivirale Wirkung der Interferone über diverse Mechanismen, von denen nur einige hier erwähnt werden können (Schneider *et al.*, 2014):

- Sensibilisierung der Immunrezeptoren und ihrer Signalwege z.B. durch Hochregulation ihrer Komponenten (z.B. RIG-I, MDA5)
- Desensibilisierung für die Wirkung von IFN, um eine überschießende Immunreaktion zu verhindern z.B. durch Hochregulation von *ubiquitin specific peptidase 18* (USP18), das über eine Interaktion mit IFNAR2 die Bindung von JAK1 und damit die Signaltransduktion verhindert.
- Hochregulation von antiviralen Effektorproteinen, insbesondere der Gruppe der RNA-Rezeptoren mit direkter antiviraler Wirkung, auf die im Folgenden näher eingegangen werden soll.

1.2.4 RNA-Rezeptoren mit direkter antiviraler Wirkung

RNA-Rezeptoren mit direkter antiviraler Wirkung vermitteln ihren Effekt, indem sie mittelbar oder unmittelbar auf die als fremd erkannte RNA Einfluss nehmen. Wichtige Vertreter dieser Gruppe sind: PKR, *interferon-induced proteins with tetratricopeptide repeats* (IFITs), *oligoadenylate synthetases* (OASs) zusammen mit *2-5A-dependent ribonuclease* (RNase L). Eine wichtige Gemeinsamkeit dieser Rezeptoren ist, dass sie in der Regel durch PRR oder IFN-I Signalwege hochreguliert werden müssen, bevor sie aktiv werden können (s.o.).

PKR kann durch mindestens 30 bp lange doppelsträngige RNA (Minks *et al.*, 1979) oder 5'-Triphosphat RNA (3p-RNA), die einzelsträngige Sekundärstrukturen aufweist (Nallagatla *et al.*, 2007), aktiviert werden. Die Aktivierung führt durch Phosphorylierung des eukaryotischen Translationsinitiationsfaktor 2a (eIF2α) zum Translationsarrest (Levin & London, 1978). Hierdurch kann die Translation viraler Proteine und damit die Virusreplikation effizient inhibiert werden. Zudem gibt es Berichte, dass PKR zu Zelltod- und IFN-I-Induktion durch doppelsträngige RNA beitragen kann (McAllister & Samuel, 2009).

Sowohl negativ-strang einzelsträngige (ss)-RNA Viren (VSV und Influenza Virus) als auch positiv-strang ss-RNA Viren (z.B. West Nil-Virus) produzieren während der Replikation RNAs mit fehlender oder unvollständiger 2'-O-Methylierung (Decroly *et al.*, 2011). Die Familie der IFIT Proteine erkennt virale RNA mit dieser molekularen Eigenschaft (Daffis *et al.*, 2010; Pichlmair *et al.*, 2011; Kumar *et al.*, 2014). IFIT1 führt nach Bindung der viralen RNA zu ihrer Sequestrierung und inhibiert damit die Initiation ihrer Translation (Habjan *et al.*, 2013). Somit führen auch diese Proteine zu einem für

RNA viralen Ursprungs spezifischen Translationsarrest. IFIT2 kann zudem bei Überexpression die Induktion intrinsischer Apoptose fördern (Stawowczyk *et al.*, 2011).

Die Familie der OAS Proteine besteht aus OAS1, 2 und 3 sowie OASL (Hornung *et al.*, 2014). OAS1, 2 und 3 binden virale, doppelsträngige RNA im Zytoplasma und synthetisieren daraufhin den *second-messenger* 2'-5'-Oligoadenylat (2-5A), der zur Dimerisierung und damit Aktivierung des RNase L-Proteins führt (Clemens & Williams, 1978; Dong & Silverman, 1997). Aktive RNase L degradiert zelluläre und virale RNA und führt damit zu Translationsarrest und programmiertem Zelltod, wodurch die weitere Vermehrung des Virus in der Wirtszelle verhindert wird (Castelli *et al.*, 1998; Li *et al.*, 2004). OASL hingegen hat keine 2-5A-Synthetase-Aktivität, sondern vermittelt seine antivirale Aktivität nach Bindung viraler RNA durch direkte Interaktion und Aktivierung von RIG-I (Zhu *et al.*, 2014; Ibsen *et al.*, 2015).

Auch wenn die RNA-Rezeptoren mit direkter antiviraler Wirkung von einer Induktion durch PRR-Signalwege abhängen, ist ihre Interaktion mit diesen Signalwegen komplexer und die hier vollzogene Einteilung nicht als strikt anzusehen. Es gibt einige Arbeiten, die einen Einfluss der direkt antiviral-wirkenden Proteine auf die Induktion von Zytokinen und IFN durch PRRs beschreiben. Beispielsweise konnte gezeigt werden, dass die RNA-Degradationsprodukte, die durch die Aktivität von RNase L entstehen, ihrerseits als Liganden von RIG-I die IFN-I Produktion steigern können (Malathi *et al.*, 2007). Die genaue molekulare Basis dieser Interaktion scheint jedoch vor dem Hintergrund, dass diese Degradationsprodukte keine klassischen Eigenschaften von RIG-I-Liganden aufweisen (fehlendes 5'-Triphosphat, nicht doppelsträngig), noch nicht vollständig geklärt. Eine kürzlich erschienene Arbeit hierzu konnte zeigen, dass die Bildung von *stress granules*, zytoplasmatisch lokalisierten RNA-Proteinkomplexen, von der Aktivierung von PKR durch die RNA-Abbauprodukte der RNase L abhängt und die Rekrutierung von PKR und RIG-I in diese *stress granules* die Induktion von IFN-I durch RIG-I fördert (Manivannan *et al.*, 2020). Somit können die RNA-Rezeptoren mit direkter antiviraler Wirkung auch mittelbar auf die Induktion von antiviralen Zytokinen Einfluss nehmen. Auf der anderen Seite konnten inzwischen auch direkte antivirale Funktionen von klassischen PRRs, ohne dass die Induktion von ISGs nötig ist, nachgewiesen werden. So demonstrierten Yao und Kollegen, dass die Adenosintriphosphat (ATP)-abhängige Aktivität von RIG-I und MDA5 die Bindung viraler Proteine an RNA verhindert und somit die Erkennung dieser RNA durch PKR oder MDA5 erleichtert wird (Yao *et al.*, 2015).

1.3 Zelltodinduktion durch Liganden von RIG-I-like-Helikasen

1.3.1 Molekulare Mechanismen der Zelltodinduktion durch Liganden von RIG-I-like-Helikasen

Seit Entdeckung von RIG-I als essentieller PRR in der antiviralen Immunantwort (Yoneyama *et al.*, 2004) ist dieser vor allem für die Fähigkeit IFN-I und pro-inflammatorische Zytokine zu induzieren bekannt. Jedoch konnte bereits Ende der 2000er Jahren festgestellt werden, dass Liganden von RLRs neben der Produktion von Zytokinen zu einer Induktion von Zelltod führen. Die vorherrschende Meinung zum molekularen Mechanismus der Zelltodinduktion ist, dass Bestandteile des RIG-I-Signalweges selbst für die Induktion von Apoptose durch RIG-I-Liganden verantwortlich sind.

Besch und Kollegen (Besch *et al.*, 2009) stellten fest, dass insbesondere Melanomzellen eine hohe Sensitivität für das Auslösen intrinsischer Apoptose über die Induktion der pro-apoptotischen BH3-only Proteine Noxa und PUMA durch RLR-Liganden haben. Dies konnte auf die fehlende Fähigkeit von Melanomzellen das anti-apoptotische Protein BCL-xL aus der Familie der BCL-2 Proteine hochzuregulieren zurückgeführt werden. Interessanterweise war die Auslösung der Apoptose durch RLR-Liganden in diesen Experimenten unabhängig von dem Transkriptionsfaktor IRF3 oder dem Rezeptorprotein IFNAR1.

Neben diesem initialen Bericht in humanen Melanomzellen gibt es eine Reihe weiterer Arbeiten, die versucht haben die molekularen Mechanismen der Zelltodinduktion durch RLRs aufzuklären.

Matsushima-Miyagi und Kollegen konnten zeigen, dass Prostatakarzinom-Zellen neben Noxa auch *TNF-related apoptosis-inducing ligand* (TRAIL) nach Transfektion von viraler RNA, die bekanntermaßen den RLR Signalweg aktiviert, hochregulieren und somit mutmaßlich über auto- und parakrine Signale TRAIL-abhängig Apoptose ausgelöst werden kann (Matsushima-Miyagi *et al.*, 2012).

Neben der Hochregulation von TRAIL konnten Kumar und Kollegen in verschiedenen Tumorzelllinien eine Herunterregulation der antiapoptotischen Proteine BCL-2, *Baculoviral IAP repeat-containing protein 3* (BIRC3, auch bekannt als cIAP2) und *protein kinase C epsilon type* (PRKCE) durch das Analogon für doppelsträngige RNA *polyinosinic:polycytidylic acid* (Poly(I:C)) oder dem *Newcastle Disease Virus* als RLR-Liganden beobachten (Kumar *et al.*, 2015). Interessanterweise zeigte sich die Regulation der anti-apoptotischen Proteine in diesem Zusammenhang als unabhängig

von dem IFN-I-Signalweg, während die Hochregulation von TRAIL von ihm abhängig zu sein schien.

Eine Studie konnte eine direkte Interaktion von Caspase 8 und MAVS in der Auslösung BAX/BAK-unabhängiger Apoptose feststellen (El Maadidi *et al.*, 2014).

Eine weitere Hypothese ist der sogenannte *RLR-induced IRF-3-mediated pathway of apoptosis* (RIPA). Hier kommt es nach Ubiquitinierung des Transkriptionsfaktor IRF-3 durch *Linear ubiquitin chain assembly complex* (LUBAC) zur Transkriptions-unabhängigen Auslösung von Apoptose (Chattopadhyay *et al.*, 2010, 2016) durch direkte Interaktion mit BAX. Wichtig ist hier zu erwähnen, dass diese Studien in nicht maligne-transformierten *mouse embryonic fibroblasts* (MEFs) durchgeführt wurden.

Die obenstehenden Mechanismen beschreiben Apoptoseinduktion in nicht-Immunzellen wie Fibroblasten oder Tumorzelllinien. In myeloiden Immunzellen hingegen, die über funktionelle Inflammasome verfügen (im Gegensatz zu den meisten Tumorzelllinien), ist auch Pyroptose durch RLR-Liganden beobachtet worden (Franchi *et al.*, 2014) und kürzlich konnte NLRP1 als direkter Sensor von doppelsträngiger RNA, der Pyroptose auslöst, in Keratinozyten nachgewiesen werden (Bauernfried *et al.*, 2020). Zudem gibt es Berichte zur Auslösung von Nekroptose, eine Form der programmierten Nekrose (Linkermann & Green, 2014), durch doppelsträngige RNA-Analoga (Zou *et al.*, 2013).

1.3.2 Immunologische Konsequenzen und Anwendung in der Immuntherapie von Tumoren

Im letzten Jahrzehnt konnte die Auslösung immunogenen Tumorzelltodes als entscheidende Komponente einer erfolgreichen Krebstherapie identifiziert werden (Galluzzi *et al.*, 2017). Die bloße Induktion (programmierten) Zelltodes zeigte sich als nicht ausreichend um anhaltende, antitumorale Wirksamkeit, beispielsweise einer zytotoxischen Chemotherapie, zu bewirken. Vielmehr bedarf es der Auslösung immunogenen Zelltodes, der zur Freisetzung von PAMPs (z.B. *high-mobility-group-protein B1* (HMGB1) oder ATP) aus den sterbenden Zellen und somit zur Rekrutierung und Aktivierung dendritischer Zellen im Tumormikromilieu führt. Über die Exposition von Calreticulin auf der Tumorzelloberfläche kommt es zur Aufnahme von Antigenen aus Tumorzellen in dendritische Zellen und durch IFN-I verstärkte Kreuzpräsentation dieser Tumorantigene wiederum zur Induktion effektiver, adaptiver Immunantworten.

Zahlreiche Arbeiten konnten zeigen, dass synthetische 5'-Triphosphat-RNA (3p-RNA) als RIG-I-Ligand starke antitumorale Wirkung über die Induktion von IFN-I und

Tumorzellapoptose hat, insbesondere in Kombination mit Immuncheckpoint-Inhibitoren (Poeck *et al.*, 2008; Besch *et al.*, 2009; Kübler *et al.*, 2010; Matsushima-Miyagi *et al.*, 2012; Ellermeier *et al.*, 2013; Glas *et al.*, 2013; Duewell *et al.*, 2015; Ruzicka *et al.*, 2020). In Studien im Pankreaskarzinom und Melanom konnte nachgewiesen werden, dass der Tumorzelltod, der durch RLR-Liganden ausgelöst wird, die Kriterien des immunogenen Zelltodes erfüllt und über die IFN-I-abhängige Aktivierung von dendritischen Zellen potente, adaptive, antitumorale Immunantworten auslöst (Duewell *et al.*, 2014; Bek *et al.*, 2019; Heidegger, Wintges, *et al.*, 2019). Diese vielversprechenden prä-klinischen Daten führten zur Initiation einer Phase I-Studie, die die Sicherheit eines RIG-I Agonisten für die intratumorale Applikation in soliden Tumoren in Kombination mit Immuncheckpoint-Inhibitoren evaluiert (NCT03739138).

1.4 Fragestellung

Obwohl es in der Literatur diverse Konzepte und Mechanismen gibt, die die Zelltodinduktion durch RLR-Liganden zu erklären versuchen, herrscht über zentrale Aspekte, wie beispielsweise die Notwendigkeit einer Aktivierung des IFNAR, noch immer Uneinigkeit. Nicht zuletzt vor dem Hintergrund des hohen Potentials von RIG-I-Liganden in der Immuntherapie von Tumoren sind genaue Kenntnisse der molekularen Mechanismen, die der Zytokin- und Zelltodinduktion durch RIG-I-Liganden zugrunde liegen, insbesondere in Tumorzellen, unentbehrlich.

In Vorarbeiten unserer Gruppe zu diesem Thema konnte interessanterweise festgestellt werden, dass die Konzentration von RIG-I-Liganden, die zur Auslösung von Apoptose nötig ist, deutlich höher ist als die, die für die Induktion von Zytokinen und IFN-I benötigt wird. Ferner konnte gezeigt werden, dass unterschiedliche Liganden der RLRs in Abhängigkeit ihrer molekularen Struktur – insbesondere ihrer Länge – in unterschiedlichem Maß in der Lage sind, Zelltod auszulösen, wobei alle in der Lage waren Zytokine und IFN-I zu induzieren. In der Folge dieser Beobachtungen und der oben geschilderten Überlegungen zur Evolution von Zelltod und der Trennung von *priming*- und Effektorphasen in seiner Auslösung, wurde die Hypothese formuliert, dass die Signalwege, die zur Zytokin- und IFN-I-Induktion führen, molekular von denen trennbar sind, die zur Zelltodinduktion führen.

Ein Problem der frühen Arbeiten zu diesem Thema ist, dass zur effizienten Inhibition der beteiligten Signalwege häufig Methoden eingesetzt werden mussten, die selbst auf doppelsträngiger RNA beruhen (*short interfering RNA* (siRNA), *short hairpin RNA* (shRNA)). Durch Interaktion dieser RNA-basierten Werkzeuge mit den untersuchten Signalwegen selbst kann es zur ungewollten Beeinflussung der Ergebnisse kommen. Zudem ist die Reduktion der Genexpression durch siRNA häufig nicht ausreichend, um vor dem Hintergrund der positiven Expressionsverstärkung durch IFN-I einen nachhaltigen *knockdown* zu erzielen. Seit Entdeckung von *clustered regularly interspaced short palindromic repeats* (CRISPR)/Cas9 (Jinek *et al.*, 2012) und der Anwendung dieses Systems zur Genmanipulation in Eukaryoten (Cong *et al.*, 2013; Mali *et al.*, 2013) können Signalwege mittels Inhibition ihrer Komponenten durch Knockouts (KOs) effizient und technisch eindeutig untersucht werden.

Ziel dieser Arbeit war es, unter Nutzung von KO-Zelllinien für verschiedene Komponenten des RIG-I Signalweges, zu untersuchen, ob und auf welcher Ebene eine

Trennung von Zytokin- und Zelltodinduktion durch RIG-I-Liganden beschrieben werden kann.

2. Material und Methoden

2.1 Zellkultur und Zell-basierte Experimente

2.1.1 Zelllinien und Kulturbedingungen

Die humane Melanomzelllinie 1205Lu wurde von Dr. Robert Besch (ehemals LMU Klinikum, LMU München) zur Verfügung gestellt und per STR-Analyse validiert. Die Melanomzelllinien C8161 (human) und B16F10 WT und *Ddx58*^{-/-} wurden von Dr. Mike Helms (Sanofi) (beschrieben in Helms *et al.*, 2019), die murinen Melanomzelllinien B16.OVA WT und *Irf3*^{-/-} x *Irf7*^{-/-} von Dr. Simon Heidegger und Prof. Hendrick Poeck (Medizinische Fakultät, Technische Universität München) zur Verfügung gestellt und wurden ebenfalls bereits beschrieben (Bek *et al.*, 2019; Heidegger, Wintges, *et al.*, 2019). 1205Lu *DDX58*^{-/-}-Zellen wurden im Rahmen des Promotionsprojektes von Johannes Rädler, 1205Lu *MAVS*^{-/-}-Zellen im Rahmen des Promotionsprojektes von Viktoria Bothe, 1205Lu *IFIH1*^{-/-}-Zellen durch Dr. Dharmendra Pandey und 1205Lu *RNASEL*^{-/-} sowie *DDX58*^{-/-} x *RNASEL*^{-/-}-Zellen im Rahmen des Promotionsprojektes von Simone Formisano generiert und mittels Sanger-Sequenzierung beziehungsweise *next generation sequencing* (NGS, RNase L KOs) und *Western Blot* validiert.

Alle Tumorzelllinien wurden in Dulbecco's *modified* Eagle's Medium, das mit 10 % fötalem Kälberserum, 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 0.1 mg/ml Streptomycin versetzt wurde, kultiviert (alle von gibco®, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten). Alle Zelllinien wurden routinemäßig auf die Abwesenheit einer Kontamination mit Mykoplasmen per PCR untersucht.

2.1.2 Transfektion mit Liganden von RIG-I-like-Rezeptoren und Infektion mit *Vesicular Stomatitis Indiana Virus*

Für Zelltodexperimente wurden 1.2 x 10⁴ Zellen pro well in 96-well Platten mit oder ohne Hinzugabe von 1000 U/ml humanem IFN-α2a (IFN-α, *research grade*, Miltenyi biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland) am Tag vor der Transfektion ausgesät. Die immunstimulatorischen RNAs wurden mit Lipofectamine RNAiMAX (Thermo Fisher Scientific) nach Herstellerangaben transfiziert. Hierbei wurde 0.1 nmol RNA mit 2.5 µl Transfektionsreagenz komplexiert. Die Induktion von Zelltod wurde nach 48 h analysiert, sofern in der Beschreibung der Abbildung nicht anders angegeben.

Zur Untersuchung der Zelltodinduktion durch Negativstrang RNA-Viren wurden Stämme des *Vesicular Stomatitis Indiana Virus* (VSV) verwendet. Neben der WT Variante von VSV wurde ein Stamm verwendet, der über eine Mutation des M-Proteins verfügt, die zu mehr IFN-I Produktion führt (VSV-M51R, Stojdl *et al.*, 2003). Weiterhin führt dieser Stamm nach erfolgreicher Infektion der Wirtszelle zur Expression des *green fluorescent protein* (GFP), um eine Abschätzung der Infektiosität zu ermöglichen. Das Virus wurde von Prof. Simon Rothenfusser (Abteilung für Klinische Pharmakologie, LMU Klinikum) zur Verfügung gestellt.

Zur Untersuchung der Zelltodinduktion durch VSV wurden 1.2×10^4 1205Lu Zellen am Vortag der Infektion pro well in 96-well Platten ausgesät. Hierauf erfolgte die Infektion mit einer *multiplicity of infection* (MOI) von 1 und die Induktion von Apoptose wurde nach 24 h mittels Durchflusszytometrie analysiert.

2.1.3 Immunstimulatorische RNAs

Die 3p-RNA wurde entweder durch ELLA Biotech (München, Deutschland) chemisch synthetisiert oder durch *in vitro*-Transkription (IVT) von einer dsDNA Vorlage (5'-GCGCTATCCAGCTTACGTAGAGCTCTACGTAAGCTGGATAGCGCTATAGTGAGTC GTATTA-3') mit Hilfe des *HiScribe™ T7 Quick High Yield RNA Synthesis Kit* (New England Biolabs GmbH, Frankfurt, Deutschland) nach Herstellerangaben generiert. Die RNA wurde hierauf mittels *RNA Clean-Up and Concentration Kit* (Norgen Biotek Corporation, Thorold, Kanada) nach Herstellerangaben gereinigt. Die Reinheit der RNA wurde exemplarisch mittels *High Pressure Liquid Chromatography* (HPLC) in einer DNAPac 200 Säule auf einem GE Äkta Micro System (GE Healthcare, Chalfont St Giles, Buckinghamshire, Großbritannien) überprüft. Die doppelsträngige OH-RNA (5'-GCGCTATCCAGCTTACGTA-3') wurde durch Metabion (München, Deutschland) synthetisiert und als Negativkontrolle („OH-RNA“) verwendet.

Zur Herstellung von Gesamt-RNA aus virusinfizierten oder nicht-infizierten 1205Lu *DDX58^{-/-}* Zellen wurde die RNA 24 h nach Infektion mit VSV-WT oder VSV-M51R (MOI: 1) mit Hilfe des VWR Total RNA Kit (VWR International, Radnor, Pennsylvania, Vereinigte Staaten) isoliert.

Zur Dephosphorylierung der 3p-RNA wurden 10 µg RNA mit 30 Units (U) *FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase* (FastAP, Thermo Fisher Scientific) oder einer Lösungskontrolle in dem vom Hersteller bereitgestellten Reaktionspuffer für 2 h bei 37 °C, gefolgt von einem Hitzeinaktivierungsschritt für 10 min bei 75 °C verdaut. Die RNA

wurde darauf wie oben beschrieben über Säulen gereinigt. Die vollständige Dephosphorylierung und Integrität der RNA wurden mittels HPLC überprüft.

Um die Bildung von intra- und intermolekularen Sekundärstrukturen der immunstimulatorischen RNAs oder ihrer Kontrollen aufzulösen wurde eine *snap cooling* Prozedur durchgeführt (Edelmann *et al.*, 2014). Hierzu wurden die RNAs in einem Thermoblock für 5 min auf 75 °C erhitzt und im Anschluss sofort auf Eis gekühlt.

Zur Analyse der Intaktheit und von Sekundärstrukturen der verwendeten immunstimulatorischen RNAs und ihrer Kontrollen erfolgte eine 3.5 % Agarose Gelelektrophorese.

Die biotinylierte 3p-RNA (3p-RNA-biot.) wurde durch eine IVT-Reaktion unter Verwendung des *HiScribe™ T7 Quick High Yield RNA Synthesis Kit* (New England Biolabs GmbH) gemäß dem Herstellerprotokoll erzeugt (siehe oben). Zur Biotinylierung der RNA wurden 2.5 mM der UTPs mit Biotin-16-UTP (Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland) ersetzt. Die Produkte wurden wie oben bereits beschrieben über Säulen gereinigt.

2.1.4 CRISPR Cas9-vermittelter Knockout von Genen

Die CRISPR Cas9-Technologie ermöglicht die effiziente Einführung von Sequenz-spezifischen Doppelstrangbrüchen in DNA, um diese zu modifizieren (Jinek *et al.*, 2012; Cong *et al.*, 2013). Die bakterielle Endonuklease Cas9 kann über kurze RNAs durch Watson-Crick Basenpaarung an spezifische Loci auf der genomischen DNA eukaryoter Zellen gelenkt werden. Darauf kommt es zur Entstehung von Doppelstrangbrüchen, die häufig über *non-homologous end-joining* (NHEJ) repariert werden, wobei es zur Einführung von Mutationen kommt, die zu einem *frame-shift* mit der Entstehung eines vorzeitigen Stopkodons und dem Funktionsverlust des Gens (Knockout, KO) führt. Dies ermöglicht die Untersuchung der Funktion individueller Gene in Zellen.

1205Lu *DDX58*-, *IFIH1*- und *MAVS*-KO-Zellen wurden in anderen Projekten (siehe oben) durch vorübergehende Transfektion von pCMV-mCherry-Cas9-Plasmiden erzeugt, die die jeweilige *single-guide*-RNA (sgRNA) enthielten, die freundlicherweise von Prof. Veit Hornung (Genzentrum, LMU München) bereitgestellt wurden. Alle anderen KOs wurden durch vorübergehende Expression der enhanced SpCas9 (1.1) zusammen mit einer sgRNA, die eine Sequenz eines frühen Exons des zu untersuchenden Gens bindet, von einem eSpCas9(1.1) Plasmid, das mit einer T2A-PuroR oder -BlastR zur Selektion modifiziert wurde, erzeugt. Tabelle 1 zeigt die hierzu verwendeten sgRNA-Sequenzen.

Die verwendeten Plasmide, pSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459) V2.0 (Addgene Plasmid #62988) und eSpCas9(1.1) (Addgene Plasmid #71814) waren ein Geschenk von Prof. Feng Zhang (Ran *et al.*, 2013; Slaymaker *et al.*, 2016).

Die erfolgreich transfizierten Zellen wurden durch Puromycin (1 $\mu\text{g/ml}$) oder Blasticidin (20 $\mu\text{g/ml}$) Selektion für 48 h angereichert, und Einzelzellklone durch Kultivierung mit limitierender Verdünnung etabliert (außer BAX und BAK). 1205Lu *DDX58*-, *IFIH1*- und *MAVS*-KO-Zellen wurden durch Sanger-Sequenzierung validiert, während alle anderen KOs durch Amplicon-basiertes NGS (Illumina MiSeq) des Genlocus, wie in Schmid-Burgk *et al.*, 2014 beschrieben, und über *Western Blot* validiert wurden. Um klonale Artefakte zu vermeiden, wurden vor den Experimenten mindestens drei validierte Klone gepoolt. Für BAX und BAK wurden polyklonale Pools nach der erfolgreichen Selektion auf die Expression von Cas9 und sgRNA untersucht. Hier wurde eine nicht-zielgerichtete Kontroll-sgRNA (sgCTRL, 5'-GCACTACCAGAGCTAACTCA-3') als Negativkontrolle verwendet.

Gen (Protein)	Spezies	Sequenz der sgRNA (von 5' nach 3')
<i>DDX58</i> (Antiviral innate immune response receptor RIG-I, RIG-I)	<i>Homo sapiens</i>	GGGTCTTCCGGATATAATCC
<i>IFIH1</i> (Interferon-induced helicase C domain-containing protein 1, MDA5)	<i>Homo sapiens</i>	GAGGGCTGCCGGTTCTCCGG
<i>MAVS</i> (Mitochondrial antiviral-signaling protein, MAVS)	<i>Homo sapiens</i>	GTACTTCATTGCGGCACTGA
<i>IRF3</i> (Interferon regulatory factor 3, IRF3)	<i>Homo sapiens</i>	GGGCAGGATCCGTGGCTTTG
<i>IFNAR1</i> (Interferon alpha/beta receptor 1, IFNAR1)	<i>Homo sapiens</i>	GCGGCTGCGGACAACACCCA
<i>BAX</i> (Apoptosis regulator BAX, BAX)	<i>Homo sapiens</i>	GTTTCATCCAGGATCGAGCA
<i>BAK1</i> (Bcl-2 homologous antagonist/killer, BAK)	<i>Homo sapiens</i>	GGTAGACGTGTAGGGCCAGA
<i>RNASEL</i> (2-5A-dependent ribonuclease, RNase L)	<i>Homo sapiens</i>	GCCGAGTTGCTGTGCAAACG

<i>Rnase1</i> (2-5A-dependent ribonuclease, RNase L)	<i>Mus musculus</i>	GTTCAGCAGAGTACGGATCA
<i>Mavs</i> (Mitochondrial antiviral-signaling protein, MAVS)	<i>Mus musculus</i>	GCCACCAGACATCCTCGCGA

Tabelle 1: sgRNA-Sequenzen, die für die Erzeugung der in der vorliegenden Arbeit verwendeten KO-Zelllinien verwendet wurden.

2.1.5 Messung der Induktion von Apoptose und Interferon-stimulierten Genen in Einzel- und Kokulturen mittels Durchflusszytometrie

Zur durchflusszytometrischen Analyse der Apoptoseinduktion wurden schwimmende und adhärenzte Zellen durch Trypsinisierung gesammelt und mit rekombinantem Annexin A5-APC, -FITC oder -PE (1:50, alle ImmunoTools GmbH, Friesoythe, Deutschland) zusammen mit *Fixable Viability Dye eFluor 780* (FVD, 1: 5000, eBioscience, Thermo Fisher Scientific) angefärbt. Die Caspase-Aktivität wurde durch Anfärben mit *Violet Live Cell Caspase Probe* (Becton, Dickinson and Company (BD), Franklin Lakes, Vereinigte Staaten) nach Herstellerangaben bestimmt. Um die IFN-I Signalstärke auf einzelnen Zellen per Durchflusszytometrie abzuschätzen, wurde die *major histocompatibility complex* (MHC)-I-Expression unter Verwendung von Alexa Fluor 488- oder Alexa Fluor 647-anti-*human*-HLA-A-, B-, C-Antikörper (1:250, BioLegend, San Diego, Kalifornien, Vereinigte Staaten) für humane oder Alexa Fluor 488-anti-*mouse*-H-2Kb-Antikörper (1:250, BioLegend) für murine Zelllinien bestimmt. Die Daten wurden mit einem BD FACS Canto II oder BD LSR Fortessa Durchflusszytometer erfasst und mit FlowJo-Software (BD) analysiert.

Kokulturen wurden verwendet, um die Zelltodinduktion in Zelllinien mit Defizienzen in Bestandteilen des RLR-Signalwegs zu untersuchen. Hierzu wurden entweder WT- oder KO-Zellen vor dem Aussäen unter Verwendung von *Cell Proliferation Dye eFluor 450* (eBioscience, Thermo Fisher Scientific) und/oder des CellTrace™ CFSE-*Cell Proliferation Kit* (Thermo Fisher Scientific) gemäß den Anweisungen des Herstellers gefärbt. Gefärbte und ungefärbte Zellen wurden in einem Verhältnis von 1: 1 gemischt und mit insgesamt 1.2×10^4 Zellen pro 96 *well* ausgesät. Um die Unterscheidbarkeit der Zelllinien sicherzustellen, wurden markierte und nicht markierte Zellen als Kontrollen einzeln kultiviert und analysiert.

2.1.6 Viabilitätsbestimmung mittels *Cell Titer Blue Assay*

Die Viabilität der Zellen wurde durch den *CellTiter-Blue* (CTB) *Cell Viability Assay* (Promega Corporation, Fitchburg, Wisconsin, Vereinigte Staaten) quantifiziert. Das CTB-Reagenz wurde hierzu mit 20 Vol.-% zum Zellkulturmedium hinzugegeben, für 2 bis 4 h inkubiert und die Fluoreszenz bei 560EX / 590EM auf einem Mithras LB 940 Multimode-Plattenleser (Berthold, Bad Wildbad, Deutschland) analysiert. Die Viabilität wurde aus der folgenden Formel berechnet: $(\text{Fluoreszenz Probe} - \text{Fluoreszenz Mediumkontrolle}) / (\text{Fluoreszenz unbehandelte Kontrolle} - \text{Fluoreszenz Mediumkontrolle}) \times 100\%$.

2.1.7 Quantifizierung von IFN- β und CXCL10 (IP-10) im Zellkulturüberstand

Zur Quantifizierung der IFN- β - oder CXCL10-Proteinlevel im zellfreien Überstand wurde dieser mittels *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) untersucht. Hierzu wurden die Kits *Human IFN-beta DuoSet ELISA* oder *Mouse IFN-beta DuoSet ELISA* (beide R&D-Systems, Bio-Techne Corporation, Minneapolis, Minnesota, Vereinigte Staaten), sowie Human IP-10 ELISA Set (BD) verwendet und gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.1.8 Inhibitoren und blockierende Antikörper

Der *small molecule* Inhibitor z-VAD-fmk (Invivogen, San Diego, Kalifornien, Vereinigte Staaten) wurde 1 h vor der RNA-Stimulation zum Zellkulturmedium mit 20 μM (+) oder 80 μM (++) hinzugegeben. Um den IFNAR Signalweg zu blockieren, wurde der *Ultra-LEAF Purified anti-mouse IFNAR1 antibody* oder der *Ultra-LEAF Purified mouse IgG1, κ isotype control antibody* als Kontrolle (5 $\mu\text{g/ml}$, beide von BioLegend) verwendet.

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Isolation und Analyse der Intaktheit zellulärer RNA

Zur Isolation von RNA wurden 1.5×10^5 Zellen in 12 well Platten ausgesät und wie in der jeweiligen Abbildung beschrieben behandelt. Nach Absaugen des Zellkulturmediums erfolgte die Hinzugabe von 400 μ l Lysepuffer (VWR) ohne weiteren Waschschrift, um eine Kontamination der Proben mit RNasen zu vermeiden. Die gesamte zelluläre RNA wurde unter Verwendung des PeqGold Total RNA Kit (VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland) nach den Empfehlungen des Herstellers isoliert.

Die Messung von Konzentration und Integrität der zellulären RNA erfolgte mittels Kapillargelelektrophorese mit dem *RNA 6000 Pico Kit* (Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornien, Vereinigte Staaten) auf einem Agilent Bioanalyzer 2100 gemäß den Herstellerangaben.

2.2.2 RNA-Sequenzierung

2.2.2.1 Durchführung

Die RNA-Sequenzierung (RNA-seq) erfolgte an der NGS-Einrichtung des Dr. von Haunerschen Kinderspitals (LMU Klinikum) durch Dr. Meino Rohlf. Kurz zusammengefasst wurden folgende Schritte durchgeführt:

Kontaminierende DNA wurde mit dem *RapidOut DNA Removal Kit* (Thermo Fisher Scientific) entfernt. Die mRNA-Anreicherung und die Herstellung der cDNA-Bibliothek wurden unter Verwendung des *Poly (A) mRNA-Magnetic Isolation Module* und des *NEBNext® Ultra II-Kits* (beide New England Biolabs) gemäß den Anweisungen des Herstellers durchgeführt. Die Sequenzierung mit 2×75 bp wurde unter Verwendung eines NextSeq 500 mit 24 Proben pro *HighOutput cartridge* (Illumina) durchgeführt.

2.2.2.2 Bioinformatische Analyse

Die bioinformatische Analyse der Daten aus der RNA Sequenzierung erfolgte am Institut für Informatik der LMU München durch Prof. Caroline C. Friedel und Michael Kluge nach folgendem Vorgehen:

Die Qualität der Sequenzierung wurde unter Verwendung von fastQC (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>) überprüft. Die *reads* wurden

gegen das humane Genom (hg38) und humane rRNA Sequenzen mit *ContextMap* Version 2.7.9 (Bonfert *et al.*, 2015) unter Verwendung von BWA (Li & Durbin, 2009) als internem *short read aligner* mit höchstens vier Fehlpaarungen pro *read* kartiert. Die Anzahl der *reads* pro Gen wurden aus den kartierten *reads* unter Verwendung von *featureCounts* (Liao *et al.*, 2014) mit *ENSEMBL-gene annotations* (Version 84) bestimmt. Die Analyse der differentiellen Genexpression wurde mit *limma* anhand der Anzahl der *reads* für alle Gene mit durchschnittlich 25 *reads* pro Probe durchgeführt (Ritchie *et al.*, 2015). Die p-Werte wurden auf mehrfaches Testen unter Verwendung der Methode von Benjamini und Hochberg (Benjamini & Hochberg, 1995) angepasst und Gene mit einem angepassten p-Wert < 0.001 wurden als signifikant unterschiedlich exprimiert betrachtet. Der Analyse-Workflow für die RNA Sequenzierung wurde mit Hilfe des Workflow-Management-Systems *Watchdog* durchgeführt (Kluge & Friedel, 2018). Die Analyse der Anreicherung für die *gene ontology: molecular function* (GO:MF) Begriffe wurde für signifikant hochregulierte Gene (angepasster p-Wert < 0.001) unter Verwendung von *clusterProfiler* (Yu *et al.*, 2012) und *org.Hs.eg.db* (v3.7.0) durchgeführt. Alle Gene, die in die differentielle Genexpressionsanalyse einbezogen worden waren, wurden als Hintergrund verwendet. Begriffe mit einem angepassten p-Wert < 0.001 wurden als statistisch signifikant betrachtet.

2.2.3 Western Blot

Zur Herstellung von Proteinlysaten wurden die pelletierten Zellen in mit Proteaseinhibitor-Cocktail (P8340, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten) ergänzten Lysepuffer, der 50 mM Tris-HCl (pH 7.8), 137 mM NaCl, 0.5 mM EDTA, 1 mM Natriumorthovanadat, 10 % (Gew./Vol.) Glycerin und 1 % (Gew./Vol.) NP40 enthielt, resuspendiert. Es folgte eine Inkubation auf Eis für 10 min. Nicht lösliche Bestandteile wurden mit 16000 g bei 4 °C für 10 min pelletiert. Die Proteinkonzentration des Lysats wurde mit dem DC™ Protein Assay (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, Kalifornien, Vereinigte Staaten) bestimmt. Typischerweise wurden 35 µg Protein jeder Probe durch 10% denaturierende SDS-PAGE getrennt, gefolgt von einem *Western Blot* auf eine PVDF-Membran unter Verwendung des TransBlot Turbo Systems (Bio-Rad). Die Blots wurden über Nacht mit den primären Antikörpern gegen BAX (polyklonal (Nr. 2772), 1:1000, Cell Signaling Technology), BAK (Klon D4E4, 1:1000, Cell Signaling Technology) oder Beta-Actin-HRP (Klon C4, 1: 2000, Santa Cruz Biotechnology), gefolgt von den sekundären Antikörpern *Goat Anti-Rabbit IgG (H + L)-HRP Conjugate* (Nr.

1706515, 1:2000, Bio-Rad) und *Goat Anti-Mouse IgG (H + L)-HRP Conjugate* (Nr. 1706516, 1:2000, Bio-Rad) für 1 h bei RT inkubiert und anschließend auf einem *ChemiDoc™ Touch Imaging System* (Bio-Rad) unter Verwendung des *Clarity Western ECL Substrates* (Bio-Rad) nach den Angaben des Herstellers detektiert.

2.2.4 Affinitätsreinigung von 3p-RNA und Massenspektrometrie

2.2.4.1 Affinitätsreinigung

3×10^6 1205Lu-Zellen wurden in 14-cm-Zellkulturschalen ausplattiert, bis sie beinahe konfluent waren, und für 16 h mit 2000 U/ml IFN- α stimuliert. Anschließend wurden die Zellen mit Trypsin abgelöst, in ein Mikrozentrifugenröhrchen überführt, zweimal mit PBS gewaschen und in 1 ml RNA-IP-Puffer (20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 50 mM NaCl, 0.25% NP-40, 1.5 mM $MgCl_2$, 1 mM NaF, Proteaseinhibitor-Cocktail (P8340, Roche) und Ribolock-RNase-Inhibitor (ThermoFisher Scientific)) für 30 min auf Eis inkubiert. Die nicht-löslichen Bestandteile wurden bei 16000 g für 20 min bei 4 °C pelletiert und das Lysat wurde bei -20 °C gelagert.

60 μ l *hydrophilic magnetic streptavidin beads* (New England Biolabs GmbH) pro Bedingung wurden mit einem Überschuss an 3p-RNA-Biot. in PBS, ergänzt mit RNase Inhibitor (RiboLock, ThermoFisher Scientific) für 2 h bei 4 °C auf einem magnetischen *rack* inkubiert. Die *beads* wurden dreimal mit eiskaltem PBS gewaschen, in 1 mg Proteinlysate in RNA-IP-Puffer resuspendiert und für 3 h bei 4 °C gedreht. Nach viermaligem gründlichem Waschen in RNA-IP-Puffer wurden die *beads* in Laemmli-Puffer resuspendiert und 5 min auf 95 °C erhitzt.

2.2.4.2 Probenvorbereitung für die Massenspektrometrie

Die Probenvorbereitung für die Massenspektrometrie, Liquid-Chromatographie-Massenspektrometrie/ Massenspektrometrie (LC-MS/MS)-Analyse und die Analyse der Primärdaten aus der Massenspektrometrie erfolgte am Deutschen Zentrum für Neurodegenerative Erkrankungen (DZNE) durch Dr. Stephan A. Mueller und Prof. Dr. Stefan F. Lichtenthaler.

Die CoIP-Proben in reduzierendem Laemmli-Puffer wurden einem modifizierten *single-pot solid-phase-enhanced* Protokoll zur Probenvorbereitung unterzogen (Hughes *et al.*, 2019). Hierzu wurden 40 μ g Sera-Mag SpeedBeads A und B (GE Healthcare) zu den Proben gegeben. Die Proteinbindung an die magnetischen *beads* erfolgte durch Zugabe

von Acetonitril (ACN) zu einem Endvolumen von 70 Vol.-% und Mischen bei 1200 rpm bei 24 °C für 30 min in einem Thermomixer (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) erreicht. Die *beads* wurden in einem *DynaMag-2*-Magnetgestell (Thermo Fisher Scientific) zurückgehalten und der Überstand verworfen. Cysteinreste wurden durch Zugabe von 25 μ l 80 mM Iodactamamid (Sigma-Aldrich) und Inkubation bei 1200 rpm bei 24 °C für 30 min im Dunkeln in einem Thermomixer (Eppendorf AG) alkyliert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 3 μ l 200 mM Dithiothreitol (BIOZOL Diagnostica Vertrieb GmbH, Eching, Deutschland) gequencht. Die Proteinbindung an die *beads* wurde für 30 min in 70 Vol.-% ACN wiederholt. Nach dem Verwerfen des Überstandes, wurden die *beads* zweimal in 200 μ l 70 Vol.-% Ethanol und zweimal in 180 μ l 100% Vol.-% ACN gewaschen. Als nächstes wurden 250 ng Lys-C und 250 ng Trypsin (Promega) in 20 μ l 50 mM Ammoniumbicarbonat (Sigma Aldrich) zugegeben. Der Proteinverdau wurde für 16 h bei RT durchgeführt. Die Proben wurden mit Ameisensäure bis zu einer Endkonzentration von 1 Vol.-% angesäuert und in das Magnetgestell gegeben. Die Überstände wurden in frische 0.5 ml *protein lobind tubes* (Eppendorf AG) überführt. 20 μ l von 2 Vol.-% DMSO wurde zu den *beads* gegeben und für 30 s in einem Wasserbad sonifiziert. Die *tubes* wurden in das Magnetgestell gestellt und die Überstände in die gleichen *tubes* überführt. Die Proben wurden in einer Vakuumzentrifuge getrocknet und in 20 μ l 0.1-prozentiger Ameisensäure gelöst.

2.2.4.3 Liquid-Chromatographie-Massenspektrometrie/Massenspektrometrie-Analyse

Die Proben wurden mittels LC-MS/MS zur relativen markierungsfreien Proteinquantifizierung analysiert. 10 μ l pro Probe wurde auf einem nanoLC-System (EASY-nLC 1200, Thermo Fisher Scientific) unter Verwendung einer hausintern verpackten C18-Säule (30 cm \times 75 μ m ID, ReproSil-Pur 120 C18-AQ, 1.9 μ m, Dr. Maisch GmbH, Ammerbuch-Entringen, Deutschland) aufgetrennt mit einem binären Gradienten von Wasser (A) und ACN (B), der 0.1% Ameisensäure bei 50 °C Säulentemperatur und einer Fließgeschwindigkeit von 250 nl/min enthält (Gradient: 0 min, 2.4 % B; 2 min, 4.8 % B; 92 min., 24 % B; 112 min., 35.2 % B; 121 min, 60 % B).

Der nanoLC wurde online über eine Nanospray-Flexionenquelle (Proxeon - Teil von Thermo Fisher Scientific), die mit einem PRSO-V2-Säulenofen (Sonation GmbH, Biberach, Deutschland) ausgestattet war, an ein *Q-Exactive HF*-Massenspektrometer (Thermo Fisher Scientific) gekoppelt. Vollständige MS-Spektren wurden mit einer Auflösung von 120000 aufgenommen. Die Top 15 Peptidionen wurden für eine *Higher-energy C-trap*-Dissoziation (HCD) mit einer normalisierten Kollisionsenergie von 26%

ausgewählt. Fragmentationenspektren wurden mit einer Auflösung von 15000 aufgenommen. Zur Peptidfragmentierung wurde ein dynamischer Ausschluss von 120 s verwendet.

2.2.4.4 Datenanalyse und markierungsfreie Quantifizierung

Die Rohdaten wurden mit der Software Maxquant (maxquant.org, Max-Planck-Institut München) Version 1.5.5.1 (Cox *et al.*, 2014) analysiert. Die MS-Daten wurden anhand einer überprüften kanonischen Fasta-Datenbank von *Homo sapiens* von UniProt durchsucht (Download: 9. Januar 2018, 20243 Einträge). Trypsin wurde als Protease definiert. Für die Datenbanksuche wurden zwei fehlende Hydrolysen erlaubt. Die Option *first search* wurde verwendet, um die Peptidmassen innerhalb eines Fensters von 20 ppm neu zu kalibrieren. Für die Hauptsuche wurden die Massentoleranzen für Peptide und Peptidfragmente auf 4.5 bzw. 20 ppm eingestellt. Die Carbamidomethylierung von Cystein wurde als statische Modifikation definiert. Die Acetylierung des Protein-N-Terms sowie die Oxidation von Methionin wurden als variable Modifikationen festgelegt. Die *false discovery rate* sowohl für Peptide als auch für Proteine wurde auf weniger als 1 % eingestellt. Die markierungsfreie Quantifizierung (LFQ) von Proteinen erforderte mindestens zwei Verhältniszahlungen von *razor* Peptiden. Zur Quantifizierung wurden nur einzigartige und *razor* Peptide verwendet. Die Option „*Match between runs*“ wurde mit einer Matching-Zeit von 1 min aktiviert. Die Proben wurden für jede Charge biologischer Replikate separat normalisiert.

Die LFQ-Proteinverhältnisse wurden zwischen den beiden Gruppen (3p-RNA/*bead*, Pulldown aus stimulierten Lysaten; Phosphatase-behandelte 3p-RNA/*bead*, Pulldown aus stimulierten Lysaten) getrennt für jedes biologische Replikat berechnet. Nach einer log₂-Transformation der Daten wurde ein t-Test verwendet, um statistisch signifikant veränderte Proteinhäufigkeiten zwischen den verschiedenen Probengruppen zu untersuchen. Als Signifikanzschwelle wurde ein p-Wert < 0.05 festgelegt.

2.3 Quantifizierung und statistische Analyse

Eine Gauß-Verteilung der Datensätze wurde angenommen. Die statistischen Details der Experimente sind in der entsprechenden Legende der Abbildung angegeben. Wenn nicht anders angegeben, wurden zweiseitige statistische Tests verwendet und die Daten repräsentieren den Mittelwert + Standardfehler (*standard error of the mean*, SEM). Die Analysen wurden mit GraphPad Prism (Version 8.2.0) und Excel (Microsoft Excel für Mac Version 16.27) durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1 RIG-I-Liganden lösen Tumorzelltod durch einen RIG-I-unabhängigen, IFN-I-abhängigen Mechanismus aus

3.1.1 Die Induktion von Zytokinen und Zelltod durch 3p-RNA ist von einem intakten RIG-I-Signalweg abhängig

Zunächst wurde die Induktion von Zytokinen und Zelltod durch 3p-RNA in 1205Lu (human) und B16 (murin) Melanomzelllinien untersucht, die einen KO für RIG-I (kodiert von den Genen *DDX58* in Menschen und *Ddx58* in Mäusen), MDA5 (nur in 1205Lu Zellen, kodiert von *IFIH1* in Menschen) und MAVS (kodiert von *MAVS* in Menschen und *Mavs* in Mäusen) aufweisen. 48 h nach Transfektion von 3p-RNA oder einer nicht-stimulatorischen Kontroll-RNA (OH-RNA) erfolgte die Messung der Zytokininduktion (MHC-I Oberflächenexpression als Surrogat in der Durchflusszytometrie und IFN- β Konzentration im ELISA des Zellkulturüberstandes) sowie Zelltodinduktion mittels Annexin A5-Assay.

In Übereinstimmung mit früheren Befunden (Besch *et al.*, 2009) konnten sowohl eine starke Induktion von Zelltod als auch eine Aktivierung von IFN-I Signalwegen durch 3p-RNA im Vergleich zu OH-RNA in WT-Zellen (Abbildung 3 a-e) beobachtet werden. Wie erwartet zeigten Zellen, denen RIG-I oder sein Adapterprotein MAVS fehlt, keine Induktion von Zelltod oder IFN-I, während MDA5 für 3p-RNA-vermittelte Signale entbehrlich war. Dies bestätigt frühere Arbeiten, dass RIG-I und MAVS sowohl für die Produktion von IFN-I als auch für die Auslösung von Zelltod unentbehrlich sind. Ferner zeigt es, dass 3p-RNA ein spezifischer Ligand für RIG-I sowohl in menschlichen als auch in murinen Melanomzellen ist.

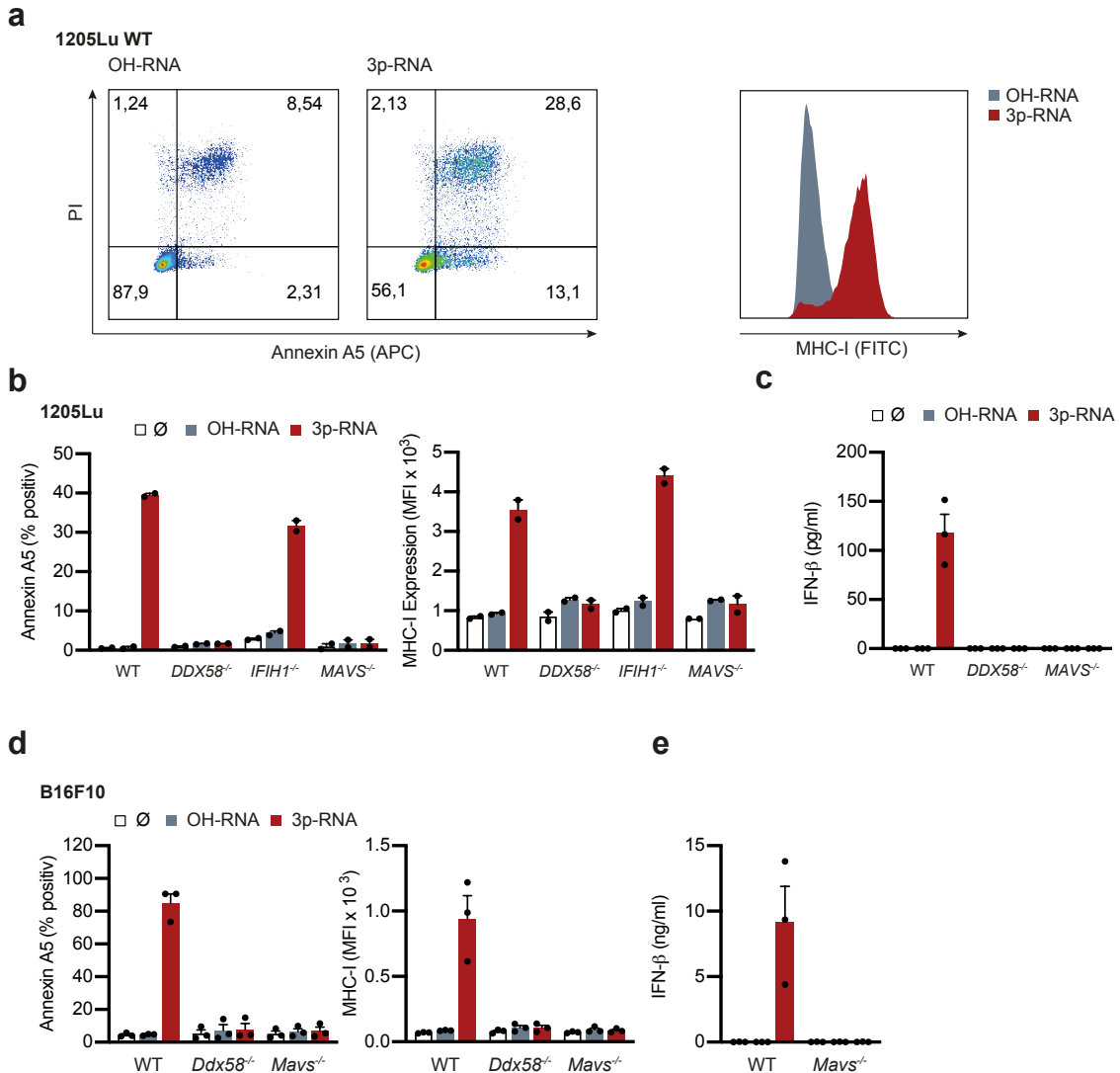


Abbildung 3: Die Induktion von Zytokinen und Zelltod durch 3p-RNA ist von einem intakten RIG-I-Signalweg abhängig

a Links: Gating Strategie in der Durchflusszytometrie für ein typisches Experiment zur Zelltodbestimmung mittels Annexin A5-Assay. Rechts: Messung der MHC-I Expressionsstärke mittels Durchflusszytometrie nach Stimulation mit 3p-RNA oder nicht-stimulierender Kontroll-RNA (OH-RNA) (beide 80 nM).

b und d 1205Lu humane Melanomzellen mit dem angegebenen Genotyp wurden mit 80 nM 3p-RNA oder OH-RNA transfiziert und nach 48 h mittels Annexin A5-Assay auf Zelltod und auf MHC-I-Expression analysiert. Der Mittelwert + SEM von zwei (**b**) bzw. drei (**d**) unabhängigen Experimenten ist gezeigt.

c und e IFN-β ELISA des Überstands von WT-, *DDX58*^{-/-} und *MAVS*^{-/-} 1205Lu- (**c**) oder B16F10- (**e**) Zellen, stimuliert mit 160 nM 3p-RNA oder OH-RNA für 48 h. Der Mittelwert + SEM von jeweils drei unabhängigen Experimenten ist gezeigt.

3.1.2 Die Zelltodinduktion durch 3p-RNA besteht aus einer IFN-I-abhängigen *priming*- und einer RIG-I-unabhängigen Effektorphase

Um die Hauptfrage dieser Arbeit zu untersuchen, wurde als nächstes ein experimentelles Szenario gesucht, in dem die Zytokin-induzierenden von den Zelltod-auslösenden Signalwegen getrennt werden können. Hierzu wurden WT- und RIG-I-defiziente Zellen in einem Verhältnis von 1:1 kokultiviert. Hierdurch war es möglich *DDX58*^{-/-}-Zellen in dem

Zytokinmilieu, das durch WT-Zellen nach Stimulation mit 3p-RNA entsteht, zu kultivieren und die Auslösung von Zelltod zu untersuchen. Die Fluoreszenzmarkierung einer der beiden Zelllinien vor dem Aussäen (siehe Material und Methoden) ermöglichte ihre Unterscheidung per Durchflusszytometrie (Abbildung 4a). Bemerkenswerterweise wurde die Fähigkeit auf eine Behandlung mit 3p-RNA Apoptose auszulösen in RIG-I-defizienten 1205Lu- und B16-Zellen unter Kokulturbedingungen wiederhergestellt (Abbildung 4 b und c). Dieser Befund zeigt, dass Zelltod- und Zytokininduktion zwei trennbare Ereignisse in der Erkennung von 3p-RNA durch das angeborene Immunsystem sind. Darüber hinaus deutet dies auf die Existenz eines oder mehrerer Faktoren hin, die von WT-Zellen bei RIG-I-Aktivierung sezerniert werden und die die Fähigkeit von 3p-RNA wiederherstellen, Zelltod in RIG-I-defizienten Zellen auszulösen. Die nächste Frage war somit, welcher Faktor in der Kokultur für das *priming* von Zelltod in RIG-I-defizienten Zellen verantwortlich ist.

IFN-I sind Zytokine, die nach Stimulation mit 3p-RNA freigesetzt werden und durch Regulierung von Hunderten von Genen einen antiviralen Zustand induzieren (Schneider *et al.*, 2014), was sie zu wahrscheinlichen Kandidaten für das *priming* des RNA-induzierten Zelltodes macht. Um diese Hypothese zu untersuchen, wurden *DDX58*^{-/-} und *MAVS*^{-/-} Zellen (nur 1205Lu) in den humanen Melanomzelllinien 1205Lu und C8161 mit rekombinantem IFN-α vor der 3p-RNA-Transfektion stimuliert. Tatsächlich konnte 3p-RNA Zelltod in den KO-Zellen nur in den mit IFN-α-vorstimulierten Zellen auslösen (Abbildung 4 d und e). Bemerkenswerterweise führte die IFN-α-Vorstimulation allein oder zusammen mit der OH-RNA-Transfektion nicht zu Zelltod, was eine direkte zytotoxische Wirkung von IFN-α oder der RNA-Transfektion ausschließt. Um festzustellen, ob IFN-I nicht nur ausreichend, sondern auch essentiell für das *priming* von RIG-I-defizienten Zellen in der Kokultur mit WT-Zellen ist, wurden Zellen verwendet, denen zusätzlich zu RIG-I auch der IFNAR1 fehlt. Im Gegensatz zu *DDX58*^{-/-} Zellen zeigten *DDX58*^{-/-} x *IFNAR1*^{-/-} Zellen nach Kokultur mit WT-Zellen keine Zelltodinduktion durch 3p-RNA (Abbildung 4 f). Das Fehlen einer Hochregulation von MHC-I auf *DDX58*^{-/-} x *IFNAR1*^{-/-} Zellen bestätigte, dass der IFNAR-Signalweg in diesen Zellen funktionslos war (Abbildung 4 g). In Übereinstimmung mit diesen Befunden zeigten IFNAR1-defiziente Zellen oder mit einem IFNAR1-blockierenden Antikörper inkubierte Zellen – trotz intakter Signalübertragung über RIG-I – einen deutlich verringerten 3p-RNA-induzierten Zelltod (Abbildung 4 h und i).

Zusammenfassend konnte somit gezeigt werden, dass Zelltod- und Zytokininduktion durch 3p-RNA zwei molekular klar trennbare Ereignisse sind. Während die

Zytokininduktion vollständig von einem intakten RIG-I Signalweg abhängt, kann die Abhängigkeit des Zelltodes davon durch ein *priming* mit exogenem IFN-I umgangen werden. Dies spricht für das Vorhandensein einer zweiten Rezeptorfamilie, die durch IFN-I induziert wird und in der Lage ist, 3p-RNA als fremd zu erkennen, um daraufhin Zelltod auszulösen.

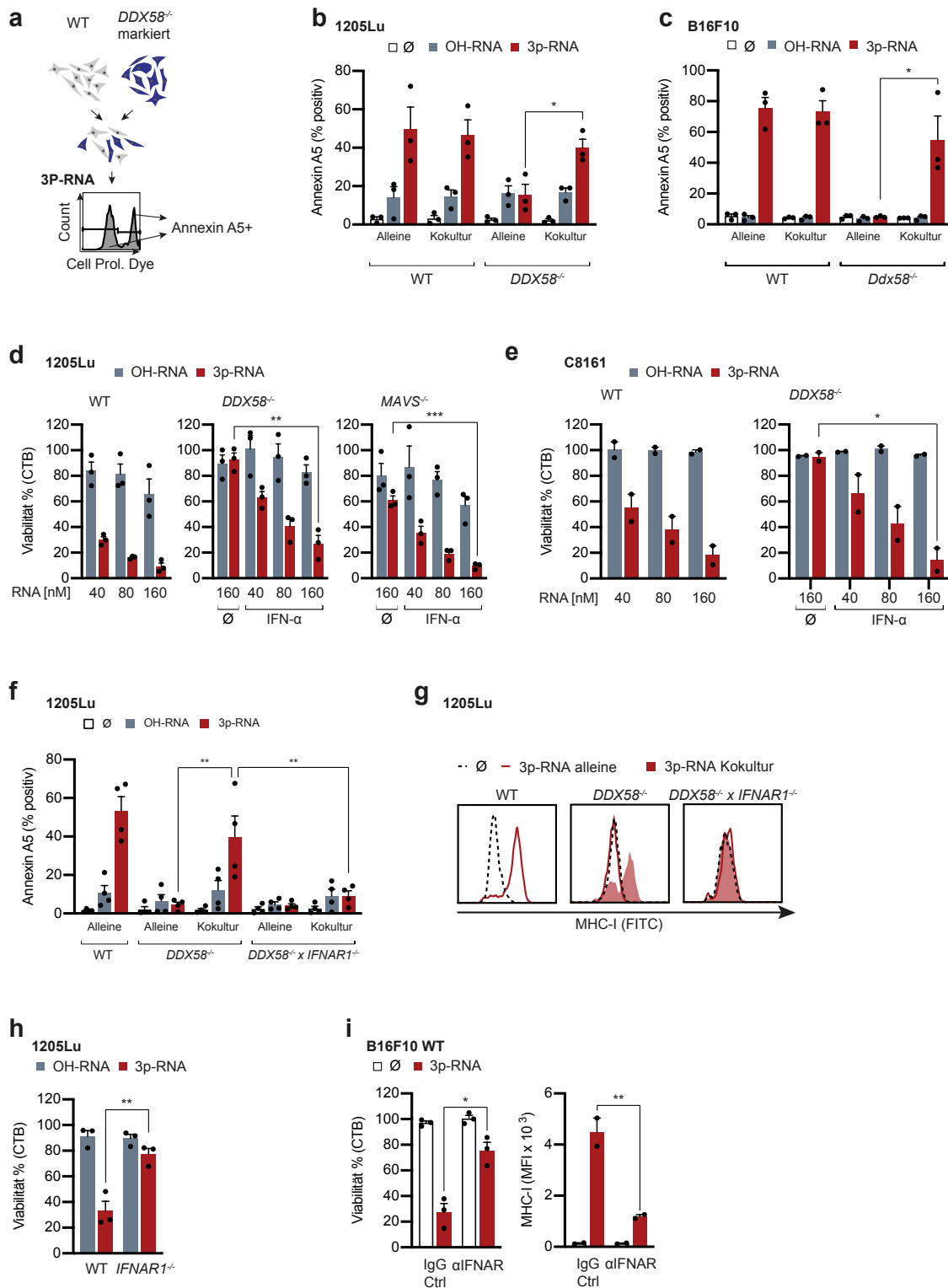


Abbildung 4: Die Zelltodinduktion durch 3p-RNA besteht aus einer IFN-I-abhängigen *priming*- und einer RIG-I-unabhängigen Effektorphase

a Schematische Darstellung des Kokultur-Experiments und der Gating-Strategie für die durchflusszytometrische Analyse. Jeweils eine markierte und unmarkierte Zelllinie mit unterschiedlichem Genotyp wurde in einem Verhältnis von 1:1 gemischt und kokultiviert. 48 h nach Behandlung mit 3p-RNA oder Kontrollen erfolgte die durchflusszytometrische Analyse der Zelltodinduktion mittels Annexin A5-Assay.

b und c WT- und RIG-I-defiziente 1205Lu- oder B16F10-Zellen wurden alleine kultiviert oder wie in **a** dargestellt kokultiviert, mit 160 nM (1205Lu) oder 80 nM (B16F10) 3p-RNA oder OH-RNA behandelt und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Der Mittelwert + SEM von drei unabhängigen Experimenten ist dargestellt. Die statistische Analyse erfolgte mittels t-Test.

d und e 1205Lu- oder C8161-Zellen der angegebenen Genotypen wurden 18 h vor der Transfektion mit 40, 80 oder 160 nM 3p-RNA oder OH-RNA mit 1000 U / ml IFN- α vorstimuliert. Die Viabilität wurde 48 h nach der RNA-Transfektion durch einen *CellTiter Blue* (CTB)-Assay untersucht. Der Mittelwert + SEM von drei (1205Lu) bzw. zwei (C8161) unabhängigen Experimenten ist gezeigt. Die statistische Analyse erfolgte mittels t-Test.

f und g WT und RIG-I-defiziente oder WT- und RIG-I/IFNAR1-defiziente 1205Lu-Zellen wurden alleine oder kokultiviert, mit 160 nM 3p-RNA oder OH-RNA behandelt und mittels Durchflusszytometrie analysiert. **f** zeigt die Auslösung von Zelltod gemessen mittels Annexin A5-Assay und **g** zeigt Histogramme der MHC-I Oberflächenexpression als Surrogat für die Stärke der Aktivierung des IFNAR Signalweges. Der Mittelwert + SEM von drei bis vier unabhängigen Experimenten ist dargestellt. Zur statistischen Analyse wurde eine *One-way-ANOVA* mit Sidaks Korrektur für multiples Testen verwendet. Die Sternchen zeigen die Ergebnisse des Post-Hoc-Tests an.

h WT und *IFNAR1*^{-/-} 1205Lu-Zellen wurden mit 3p-RNA oder OH-RNA (160 nM) transfiziert. Die Viabilität wurde 48 h nach der Transfektion durch einen CTB-Assay gemessen. Der Mittelwert + SEM von drei unabhängigen Experimenten ist dargestellt. Die statistische Analyse erfolgte mittels t-Test.

i B16F10 WT Zellen wurden mit 80 nM 3p-RNA oder OH-RNA in Gegenwart eines IFNAR-blockierenden oder IgG-Kontroll-Antikörpers (5 μ g/ml) stimuliert. Die Viabilität wurde nach 48 h durch CTB-Assay bestimmt. Die IFN-I-Signalstärke wurde durch Messen der MHC-I-Expression durch Durchflusszytometrie geschätzt. Der Mittelwert + SEM von drei (CTB) oder zwei (MHC-I-Expression) unabhängigen Experimenten ist dargestellt. Die statistische Analyse erfolgte mittels t-Test.

* p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001.

3.1.3 IRF3 ist essentiell für die *priming*-Phase der Zelltodinduktion durch 3p-RNA

Nachdem dem Transkriptionsfaktor IRF3 neben seiner bekannten Rolle in der Induktion von IFN-I durch verschiedene PRR Signalwege auch eine Rolle in der Transkriptions-unabhängigen Induktion von Apoptose nach Stimulation von RLRs zugeschrieben wird (Chattopadhyay *et al.*, 2010, 2016), sollte dieser genauer untersucht werden. Dafür wurden IRF3 KO-Zellen generiert und auf die Induktion von Zelltod durch 3p-RNA in der An- oder Abwesenheit von IFN-I untersucht. Der Zelltod durch 3p-RNA war in 1205Lu *IRF3*^{-/-} Zellen stark reduziert, konnte jedoch durch Zugabe von exogenem IFN- α wiederhergestellt werden (Abbildung 5 a). Vergleichbare Ergebnisse konnten in B16.OVA Zellen, die einen KO für *Irf3* und *Irf7* aufweisen erzielt werden: Wurden die Zellen alleine kultiviert, zeigte sich eine deutlich reduzierte Zelltodinduktion im Vergleich zu WT-Zellen, während dieser unter Kokultur-Bedingungen vollständig wiederhergestellt werden konnte (Abbildung 5 b). Diese Ergebnisse sprechen gegen eine direkte Beteiligung von IRF3 an der 3p-RNA-induzierten Apoptose, legen jedoch nahe, dass IRF3 für das transkriptionelle *priming* einer sekundären Rezeptorfamilie durch IFN-I benötigt wird.

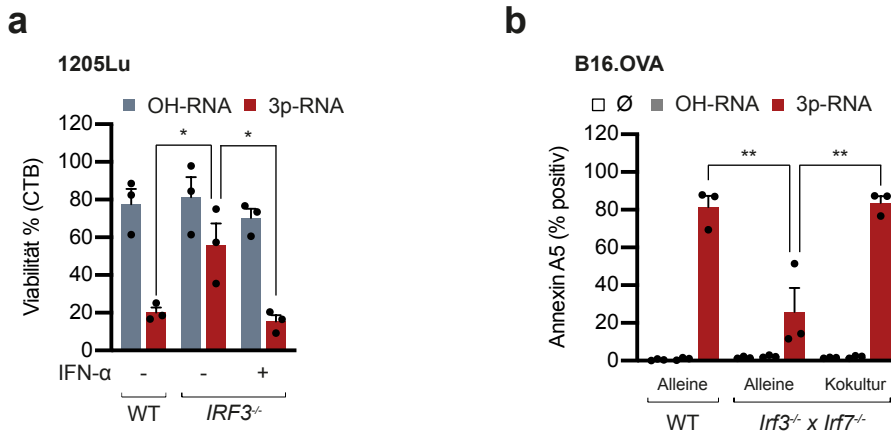


Abbildung 5: IRF3 ist essentiell für die *priming*-Phase der Zelltodinduktion durch 3p-RNA

a WT und IRF3^{-/-}1205Lu Zellen wurden mit 1000 U/ml IFN- α für 18 h vorstimuliert, bevor die angegebenen RNAs wie gezeigt transfiziert wurden (160 nM). Die Viabilität wurde im CTB-Assay gemessen. Der Mittelwert + SEM von drei unabhängigen Experimenten ist dargestellt.

b Kokultur von B16.OVA WT- und IRF3^{-/-} x IRF7^{-/-}-Zellen, die für 48 h mit 3p-RNA (80 nM) behandelt wurden. Der Mittelwert + SEM von drei unabhängigen Experimenten ist dargestellt.

* p < 0.05, ** p < 0.01.

3.1.4 Die Exekution von Zelltod durch das *Vesicular Stomatitis Indiana Virus* ist unabhängig von RIG-I

Um auszuschließen, dass diese Ergebnisse spezifisch für synthetische 3p-RNA sind, wurden die Untersuchungen auf Liganden von RIG-I ausgedehnt, die während einer Virusinfektion produziert werden. Das VSV ist ein einzelsträngiges negativ-Strang RNA-Virus und ein häufig genutztes Modell für Viren, die in ihren Wirtszellen RIG-I-abhängig IFN-I produzieren (Kato *et al.*, 2006). Neben der WT Variante wurde hier ein VSV-Stamm verwendet, der über eine Mutation des M-Proteins verfügt, die zu mehr IFN-I Produktion führt (Stojdl *et al.*, 2003). Zudem führt dieser Stamm nach erfolgreicher Infektion der Wirtszelle zur Expression von GFP, was in der Durchflusszytometrie zur Abschätzung der Infektiosität herangezogen werden kann.

Zunächst wurde die gesamte RNA aus Zellen, die für 24 h mit VSV-WT oder VSV-M51R infiziert worden waren, isoliert und in 1205Lu WT oder DDX58^{-/-} Zellen transfiziert. Nach 48 h wurden die Viabilität der Zellen mittels CTB-Assay und die CXCL10 Konzentration im Überstand mittels ELISA bestimmt (Abbildung 6 a und b). In WT Zellen reduzierten VSV-RNAs die Viabilität signifikant im Vergleich zu Kontroll-RNA, die aus nicht-infizierten Zellen isoliert worden war. Erneut zeigten RIG-I-defiziente Zellen nur dann eine ausgeprägte Induktion von Zelltod, wenn sie vor der RNA-Transfektion mit IFN- α stimuliert wurden (Abbildung 6 a). Die Analyse der CXCL10-Sekretion aus WT-Zellen

bestätigte, dass nur RNA aus VSV-infizierten Zellen immunstimulierend war (Abbildung 6 b).

Um Zelltodinduktion unabhängig von RIG-I in einer tatsächlichen Infektionssituation zu untersuchen, wurde erneut das Kokulturmodell verwendet. RIG-I-defiziente 1205Lu Zellen zeigten, wenn sie alleine kultiviert wurden, eine drastisch reduzierte Induktion von Zelltod 24 h nach Infektion mit VSV-M51R (Abbildung 6 c), obwohl sie eine deutlich höhere GFP-Expression als Indikator für Infektiosität aufwiesen (Abbildung 6 d). In der Kokultur hingegen fand sich signifikant mehr Zelltod in RIG-I-defizienten Zellen durch VSV-M51R im Vergleich zur Kultur alleine. Die Expression von GFP wurde in der Kokultur auf das Niveau der WT Zellen reduziert, was mutmaßlich auf das parakrine IFN-I-Signal zurückzuführen ist.

Diese Daten zeigen somit, dass die Ergebnisse, die zuvor mit einem synthetischen RIG-I-Liganden erzielt wurden, auch auf natürliche Liganden von RIG-I erweitert werden können.

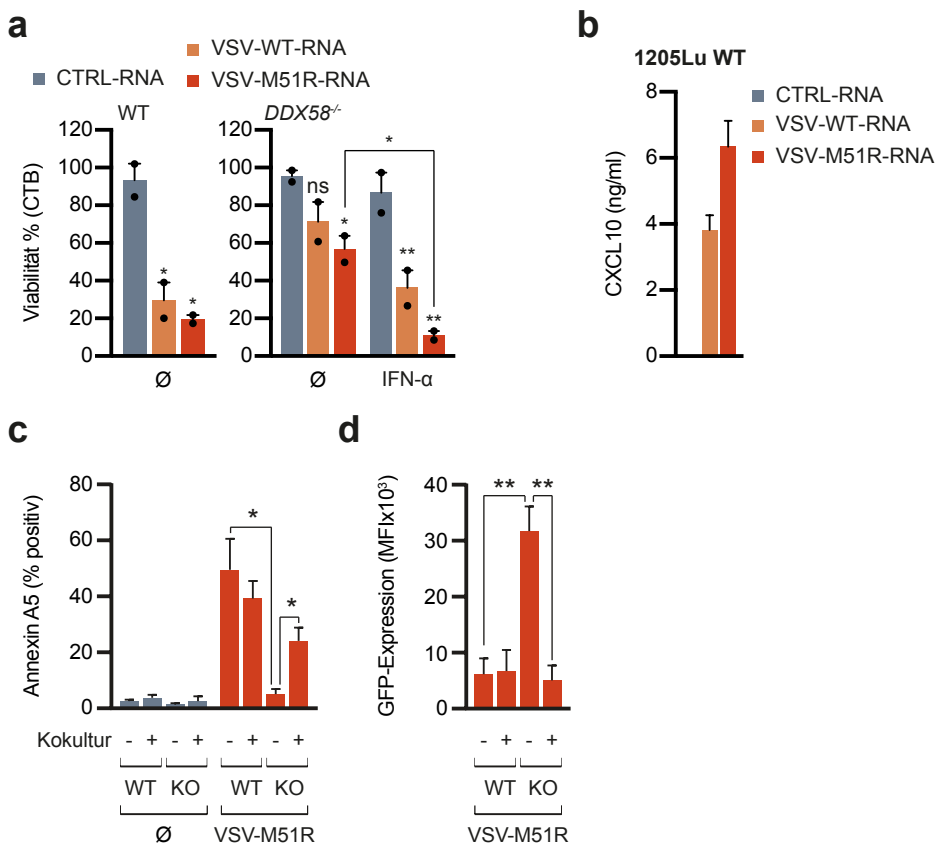


Abbildung 6: Die Exekution von Zelltod durch das *Vesicular Stomatitis Indiana Virus* ist unabhängig von RIG-I

a und **b** 1205Lu WT und DDX58^{-/-} Zellen wurden mit 1 µg/ml Gesamt-RNA, die aus Zellen isoliert wurde, die mit WT- oder M51R-Vesicular Stomatitis Virus (VSV) infiziert worden waren, transfiziert (siehe auch Material und Methoden). Als Kontrolle diente RNA aus nicht Virus-infizierten Zellen (CTRL). 48 h nach Transfektion

erfolgte die Analyse von Zelltod- und Zytokininduktion durch CTB-Assay (a) und CXCL10 ELISA (b, nur 1205Lu WT). *DDX58*^{-/-} Zellen wurden 18 h vor der RNA-Transfektion mit IFN-α oder nur Medium (ø) behandelt. Der Mittelwert + SEM von zwei unabhängigen Experimenten ist dargestellt. Zur statistischen Analyse erfolgte eine *One-way*-ANOVA (WT) oder *Two-way*-ANOVA (*DDX58*^{-/-}), gefolgt von Sidaks Test für multiples Testen. Die Sternchen zeigen die Ergebnisse des Post-Hoc-Tests an. Das Sternchen auf den Balken steht für den Vergleich mit CTRL-RNA.

c und d 1205Lu WT und *DDX58*^{-/-} Zellen wurden alleine oder in Kokultur mit VSV-M51R-GFP (MOI: 1) infiziert. Nach 24 h wurde die Zelltodinduktion (c) und die GFP-Expression (d) als Surrogat für die Infektiosität (Virusreplikation) per Durchflusszytometrie gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte + SEM von drei unabhängigen Experimenten.

* p < 0.05, ** p < 0.01.

3.1.5 3p-RNA löst intrinsische Apoptose aus

Um die Signalwege, die zur Auslösung von Zelltod in RIG-I-kompetenten oder -defizienten Zellen führen, näher zu charakterisieren, wurde die Aktivierung von zentralen Bestandteilen des Apoptose-Signalweges untersucht. Apoptose ist eine der Zelltodformen, die bekanntermaßen nach Stimulation mit viraler, doppelsträngiger RNA aktiviert wird. Zunächst wurde die Aktivierung der Caspasen-Kaskade durch ein Substrat, das nach Hydrolyse durch Caspase 3 und 7 ein fluoreszierendes Signal erzeugt, per Durchflusszytometrie gemessen. Wie erwartet war die Aktivierung von Caspasen ohne die Hinzugabe von exogenem IFN-I stark von einem intakten RIG-I Signalweg abhängig (Abbildung 7 a). Nach Vorstimulation von RIG-I- oder MAVS-defizienten Zellen mit IFN-α hingegen, konnte die Fähigkeit dieser Zellen Caspasen zu aktivieren wiederhergestellt werden.

Durch die Inhibition der Caspasenaktivität mit dem Pan-Caspase Inhibitor z-VAD-fmk (z-VAD) konnte eine Abhängigkeit des Zelltodes durch 3p-RNA von Caspasen sowohl in WT als auch in *DDX58*^{-/-} Zellen nachgewiesen werden (Abbildung 7 b).

Mit RLR-induzierter Apoptose sind bisher sowohl die Signalwege der intrinsischen wie der extrinsischen Apoptose in Verbindung gebracht worden (Besch *et al.*, 2009; Chattopadhyay *et al.*, 2010; Matsushima-Miyagi *et al.*, 2012). Der entscheidende Schritt in der Aktivierung der intrinsischen Apoptose ist die MOMP durch die Poren-bildenden Proteine BAX und BAK. Um die Rolle von intrinsischer Apoptose durch 3p-RNA zu untersuchen, wurden die Gene *BAX* und *BAK1* in 1205Lu WT und *DDX58*^{-/-} Zellen mittels CRISPR/Cas9 ausgeknockt. Die Effizienz des KO wurde mittels *Western* Blot überprüft (Abbildung 7 c). Sowohl in WT als auch in RIG-I-defizienten Zellen konnte eine signifikante Reduktion des Zelltodes nach Stimulation mit 3p-RNA nach KO von *BAX* und *BAK1*, die mit dem Maß der Reduktion der Proteinexpression korrelierte, gemessen werden (Abbildung 7 d).

Zusammenfassend stellt intrinsische Apoptose somit den primären Signalweg in der Auslösung von Zelltod durch 3p-RNA in WT und RIG-I-defizienten Zellen dar.

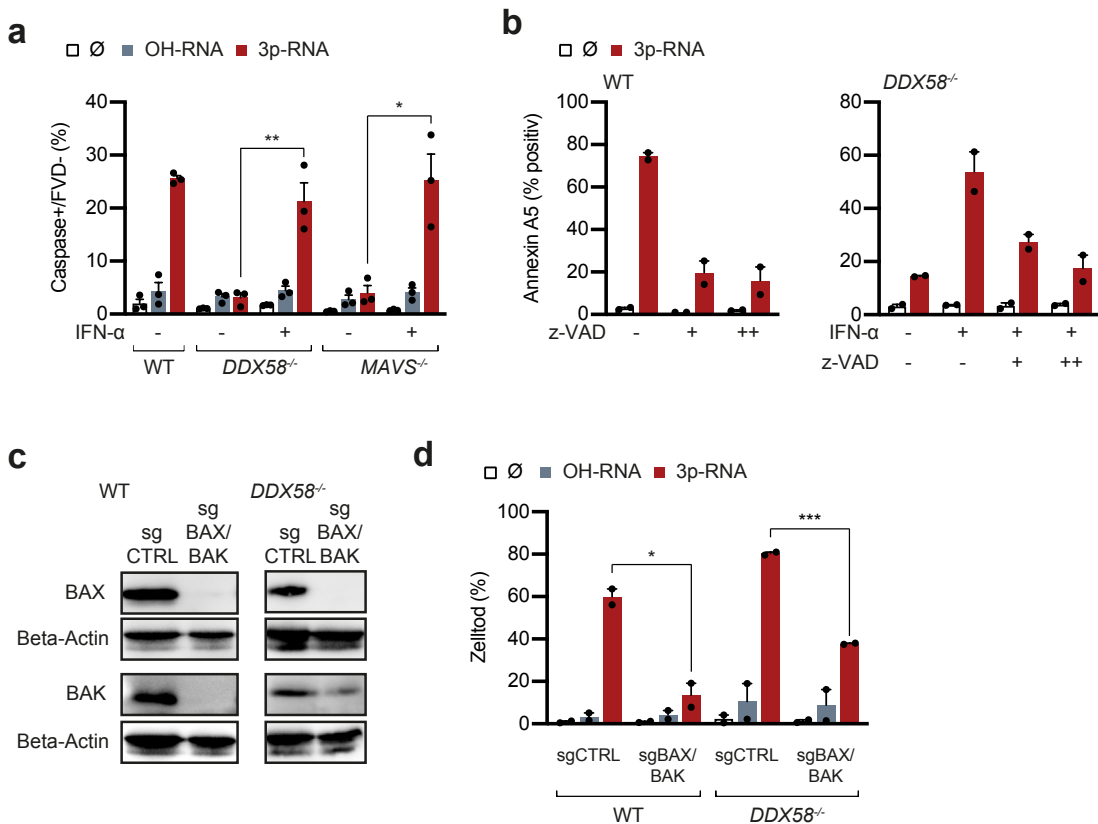


Abbildung 7: 3p-RNA löst intrinsische Apoptose aus

a 1205Lu Zellen mit den angegebenen Genotypen mit oder ohne Vorstimulation mit IFN-α für 18 h wurden mit 3p-RNA transfiziert. Zellen mit Caspasen-Aktivität und ohne Permeabilisierung der Zellmembran (FVD negativ) wurden mittels Durchflusszytometrie 30 h nach Stimulation gemessen. Der Mittelwert + SEM von drei unabhängigen Experimenten ist gezeigt.

b 1205Lu Zellen wurden mit dem Pan-Caspase Inhibitor z-VAD-fmk (z-VAD, 20 μM: +, oder 80 μM: ++) oder der Lösungskontrolle (DMSO) für 1 h vor Stimulation mit RNA inkubiert. Der Zelltod wurde mittels Annexin A5-Färbung nach 48 h bestimmt. Der Mittelwert + SEM von zwei unabhängigen Experimenten ist gezeigt.

c Western Blots der BAX und BAK Expression in WT und RIG-I-defizienten 1205Lu Zellen nach KO von BAX und BAK1 oder Behandlung mit einer irrelevanten Kontrolle (sgCTRL). Ein repräsentatives Ergebnis von zwei unabhängigen Experimenten ist gezeigt.

d Zelltodinduktion durch 3p-RNA-Behandlung (160 nM) 48 h nach Transfektion gemessen mittels Annexin A5/FVD-Assay in 1205Lu WT und DDX58^{-/-} Zellen mit oder ohne Vorstimulation mit 1000 U/ml IFN-α. Der Mittelwert + SEM von 2 unabhängigen Experimenten ist gezeigt.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

3.2 3p-RNA führt zur Aktivierung des OAS1/RNase L-Signalweges

3.2.1 Die Veränderung der Genexpression RIG-I-defizienter Zellen durch Stimulation mit 3p-RNA ist von einer Vorstimulation mit IFN-I abhängig

Die entscheidende Frage war somit welcher Rezeptor/Signalweg, der doppelsträngige RNA erkennt, für die Auslösung von Apoptose durch RIG-I-Liganden verantwortlich ist. Um die Ereignisse nach 3p-RNA Stimulation in WT und RIG-I-defizienten (mit und ohne Vorstimulation mit IFN- α) weiter zu charakterisieren, wurde das Transkriptom der Zellen mittels RNA-seq bestimmt und die differenzielle Genexpression analysiert (Abbildung 8 a).

Sechs Stunden nach Transfektion mit 3p-RNA zeigten WT Zellen signifikante Veränderungen der mRNA-Expression in mehr als 4000 Genen im Vergleich zu einer nicht stimulierten Kontrolle (Abbildung 8 a, links). Im Gegensatz dazu wurde kein einziges Gen durch 3p-RNA-Behandlung in *DDX58*^{-/-} Zellen differentiell exprimiert (Abbildung 8 a, Mitte). Dies zeigte erneut, dass 3p-RNA einen hochspezifischen RIG-I-Liganden in nicht-vorstimulierten Zellen darstellt.

IFN- α -vorbehandelte und 3p-RNA-transfizierte *DDX58*^{-/-} Zellen hingegen zeigten eine signifikant veränderte Expression von mehr als 6000 Genen im Vergleich zu Zellen, die nur mit IFN- α behandelt wurden (Abbildung 8 a, rechts). Dies offenbarte, dass 3p-RNA unabhängig von RIG-I nach *priming* von sekundären Rezeptorsystemen durch IFN-I über transkriptionelle oder post-transkriptionelle Mechanismen zu einer drastischen Änderung von Genexpression führt.

Um diese Veränderungen in der Genexpression weiter zu untersuchen wurde eine Analyse der Genontologie (GO) der hochregulierten Gene nach ihrer molekularen Funktion (MF) durchgeführt (Abbildung 8 b). Hier ergab sich eine Anreicherung von Genen in der Regulation von Transkription und u.a. der Bindung von DNA, mRNA, Histonen und Chromatin. Jedoch ließen sich aus diesen Daten keine bekannten Signalwege ableiten, die mit RNA-Erkennung oder der Auslösung von Apoptose in Verbindung gebracht werden konnten.

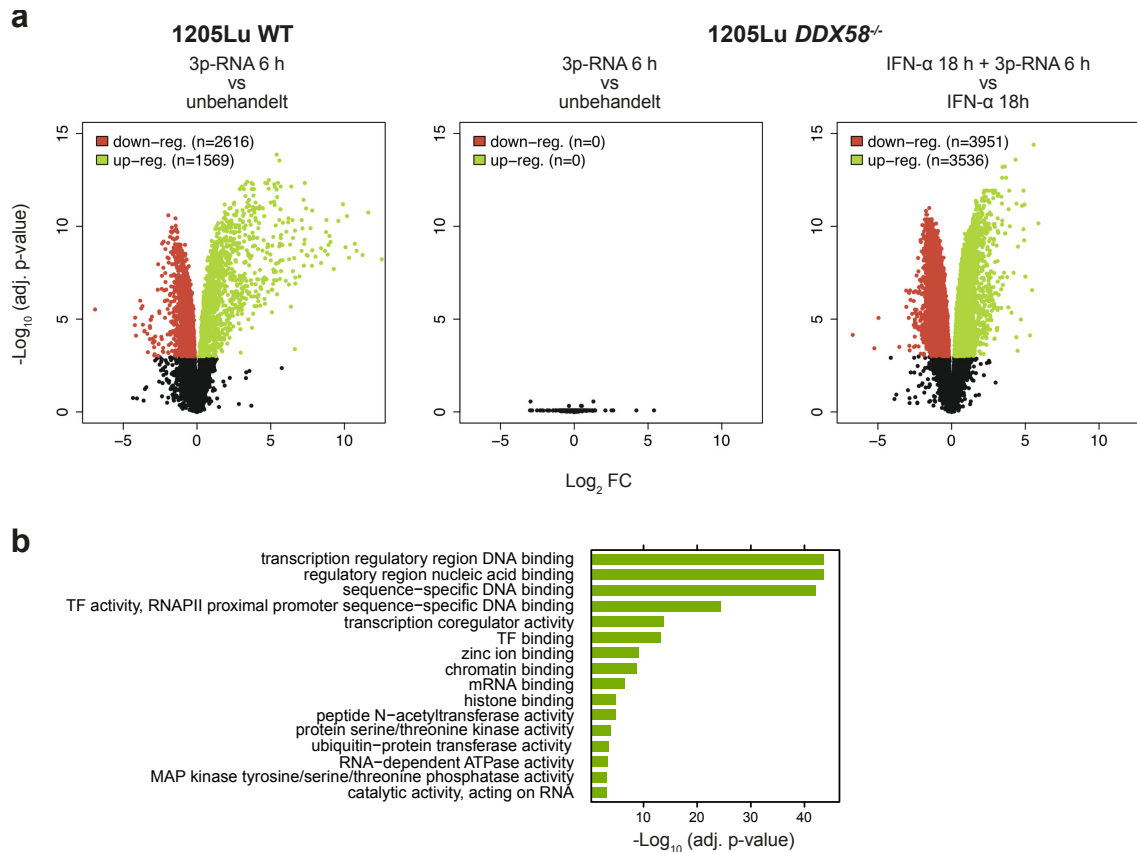


Abbildung 8: Die differenzielle Genexpression RIG-I-defizienter Zellen nach Stimulation mit 3p-RNA ist von einer Vorstimulation mit IFN-I abhängig

a Volcano plots der differentiellen Genexpression (\log_2 fold change (FC) in WT (links), *DDX58*^{-/-} (Mitte) oder *DDX58*^{-/-} Zellen, die mit 1000 U/ml IFN-α für 18 h vorstimuliert wurden (rechts), nach Stimulation mit 3p-RNA für 6 h verglichen mit der unbehandelten Kontrolle. Rote Punkte repräsentieren herunterregulierte, grüne Punkte hochregulierte Gene (p-Wert nach Adjustierung für multiples Testen < 0.001).

b Analyse der Anreicherung der *gene ontology molecular funktion* (GO: MF) Begriffe für in *DDX58*^{-/-} hochregulierten Genen nach Behandlung mit IFN-α (18 h) und 3p-RNA (6 h) verglichen mit einer Kontrolle, die mit IFN-α, jedoch nicht mit 3p-RNA behandelt wurde. Die bioinformatische Auswertung wurde durch Michael Kluge und Prof. Caroline C. Friedel (Institut für Informatik, LMU, München) unterstützt.

3.2.2 Proteine aus der Familie der RNA-Rezeptoren mit direkter antiviraler Wirkung werden durch IFN-I hochreguliert

Zur weiteren Eingrenzung der Signalwege, die möglicherweise an der Erkennung von 3p-RNA und der RIG-I-unabhängigen Auslösung von Apoptose beteiligt sind, erfolgte die Analyse des Transkriptoms nach Stimulation mit IFN-α in 1205Lu *DDX58*^{-/-} Zellen.

Die Behandlung mit IFN-α für vier Stunden führte zu einer signifikanten Hochregulation von insgesamt 788 Genen (Abbildung 9 a). Um davon die für die Erkennung von RNA relevanten Gene zu erhalten, wurde die Überlappung dieser Gene mit denen der GO: MF-Begriffe „double-stranded RNA binding“ und „RNA binding“ bestimmt. Insgesamt 71 Gene erfüllten diese Kriterien.

Unter den 30 Genen mit der höchsten Änderung ihrer Expression nach Stimulation mit IFN- α fanden sich einige Mitglieder aus der Gruppe der RNA-Sensoren mit direkter antiviraler Aktivität (Abbildung 9 b). Dazu zählte PKR (Gen: *EIF2AK2*), Mitglieder aus der IFIT Familie (*IFIT1*, *IFIT2*, *IFIT3*, *IFIT5*) und alle bekannten Gene der OAS Proteine (*OASL*, *OAS1*, *OAS2*, *OAS3*). Dies machte sie zu wahrscheinlichen Kandidaten für eine Involvierung in der 3p-RNA-induzierten Apoptose. Diese Daten konnten somit genutzt werden, um die Ergebnisse aus der Proteinanreicherung nach Affinität und Massenspektrometrie einzugrenzen (siehe Kapitel 3.2.4).

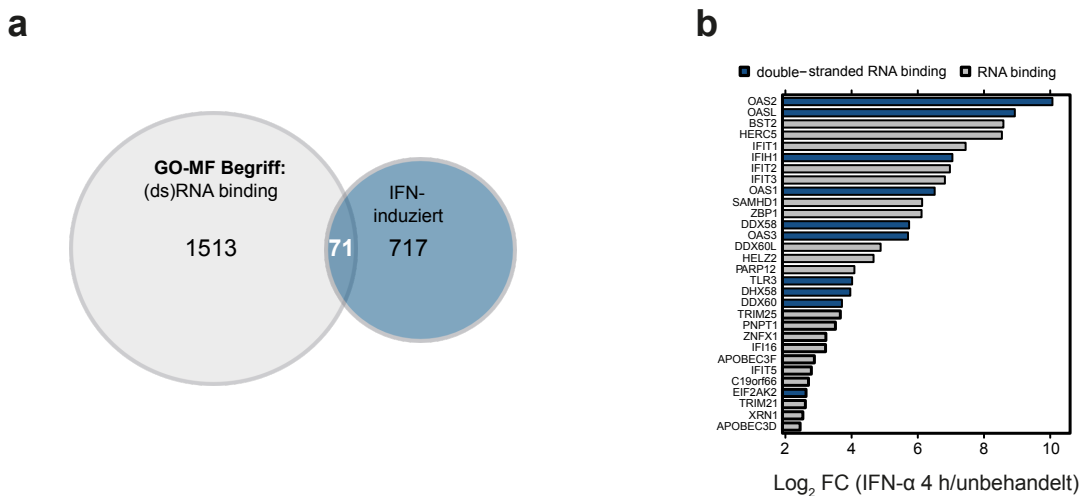


Abbildung 9: Proteine aus der Familie der RNA-Rezeptoren mit direkter antiviraler Wirkung werden durch IFN-I hochreguliert

a Venn-Diagramm, das die Überlappung zwischen den mit der *gene ontology molecular funktion* (GO: MF) „double-stranded RNA binding“ oder „RNA binding“ annotierten Genen und den Genen zeigt, die signifikant in 1205Lu *DDX58*^{-/-} Zellen durch eine Behandlung mit 1000 U/ml IFN- α für 4 h hochreguliert wurden (adj. p-Wert < 0.001).

b Log₂ fold-change (FC) von Genen, die mit den GO: MF Begriffen „double-stranded RNA binding“ (blau) oder „RNA binding“ (grau) annotiert sind, bestimmt durch RNA-seq in 1205Lu *DDX58*^{-/-} Zellen, die für 4 h mit IFN- α stimuliert wurden, verglichen zur unbehandelten Kontrolle. Die Gene wurden nach Induktionsstärke geordnet. Die Top 30 Gene mit der höchsten log₂ FC sind dargestellt.

3.2.3 Die Induktion von Zelltod durch 3p-RNA ist abhängig von der 5'-Triphosphat-Gruppe und unabhängig von *hairpin*- oder instabilen Sekundärstrukturen

Neben der Charakterisierung von Seite der potentiellen IFN-induzierten Rezeptoren sollten die biochemischen Charakteristika, die zur Auslösung von Zelltod nötig sind, näher untersucht werden.

Die 5'-Triphosphat-Gruppe viraler RNA ist ein starkes PAMP für ihre Unterscheidung von endogener RNA und sie ist essentiell für die Erkennung kurzer doppelsträngiger RNA durch RIG-I (Hornung *et al.*, 2006; Nallagatla *et al.*, 2007; Pichlmair *et al.*, 2011). Um die

Notwendigkeit der 5'-Triphosphat-Gruppe für die Auslösung von Zelltod zu untersuchen, wurden 1205Lu *DDX58*^{-/-}-Zellen mit einer durch FastAP-behandelten RNA (3p-RNA + FastAP) stimuliert und die Induktion von Zelltod gemessen (Abbildung 10 a). Diese zeigte sich durch die Behandlung der RNA mit FastAP deutlich reduziert.

Ein weiteres PAMP, das zur Erkennung viraler RNA im Zytoplasma von infizierten Zellen beitragen kann, sind intramolekulare Sekundärstrukturen (Schlee & Hartmann, 2016). Es wurde einerseits eine RNA verwendet, die durch *Annealing* von 2 einzelsträngigen Molekülen erzeugt worden ist (OH-CO4-ds) und somit nicht über einen sogenannten *hairpin* verfügt. Andererseits wurden RNAs untersucht, die aus einem einzelnen Strang bestehen, der bis auf einen *hairpin* mit sich selbst komplementär ist (OH-CO4-hp, 3p-CO4-hp, 3p-GFP-hp). Dieser *hairpin* in der Mitte des Moleküls besteht aus 4 Basen (5'-AGCU-3') und ermöglicht die Basenpaarung der komplementären Stränge. Es ist jedoch auch denkbar, dass sich komplexere, instabilere Sekundärstrukturen als diese oder intermolekulare Sekundärstrukturen bilden, über die eine Aktivierung von Rezeptoren, die Zelltod auslösen, erfolgt.

Um zu untersuchen, ob die verwendeten RNAs in mehreren Konformationen vorliegen können, erfolgte eine native Agarose-Gelelektrophorese mit und ohne Durchführung einer sogenannten *snap cooling*-Prozedur (Abbildung 10 b). Durch *snap cooling* kann typischerweise das Auftreten der stabilsten Konformation der RNA begünstigt werden (Edelmann *et al.*, 2014). In der Tat fand sich eine zusätzliche Bande zu der erwarteten, die ungefähr bei der doppelten als der erwarteten Höhe lief, nur in den RNAs, die über eine *hairpin*-Struktur verfügten und bei denen kein *snap cooling* durchgeführt worden war. Somit scheint die *hairpin*-Struktur die Ausbildung instabiler intra- oder intermolekularer Sekundärstrukturen zu begünstigen.

Als nächstes sollte der Einfluss des *hairpins* und der Sekundärstrukturen auf die Zelltodinduktion, der in Abbildung 10 b verwendeten RNAs, untersucht werden. 1205Lu WT oder IFN- α -vorstimulierte *DDX58*^{-/-}-Zellen zeigten nach Transfektion von 3p-RNA (3p-CO4-hp) Induktion von Zelltod, unabhängig vom Vorhandensein von Sekundärstrukturen (Abbildung 10 c). Interessanterweise zeigte eine chemisch synthetisierte RNA mit identischer Sequenz und *hairpin*, jedoch ohne 5'-Triphosphat Struktur (OH-CO4-hp) eine Induktion von Zelltod, nur wenn Sekundärstrukturen vorhanden waren.

Zusammenfassend scheint für die Erkennung von kurzen 3p-RNA im Rahmen des Zelltod-Signalweges die 5'-Triphosphat-Gruppe notwendig, während die Formierung von instabilen Sekundärstrukturen durch die *hairpin*-Struktur nicht erforderlich ist. Die

Notwendigkeit der 5'-Triphosphat-Struktur zur Erkennung von RNA durch Rezeptoren, die Zelltod auslösen, kann hingegen durch die Formation instabiler Sekundärstrukturen umgangen werden. Die molekulare Basis dieser Erkennung ist gegenwärtig unklar.

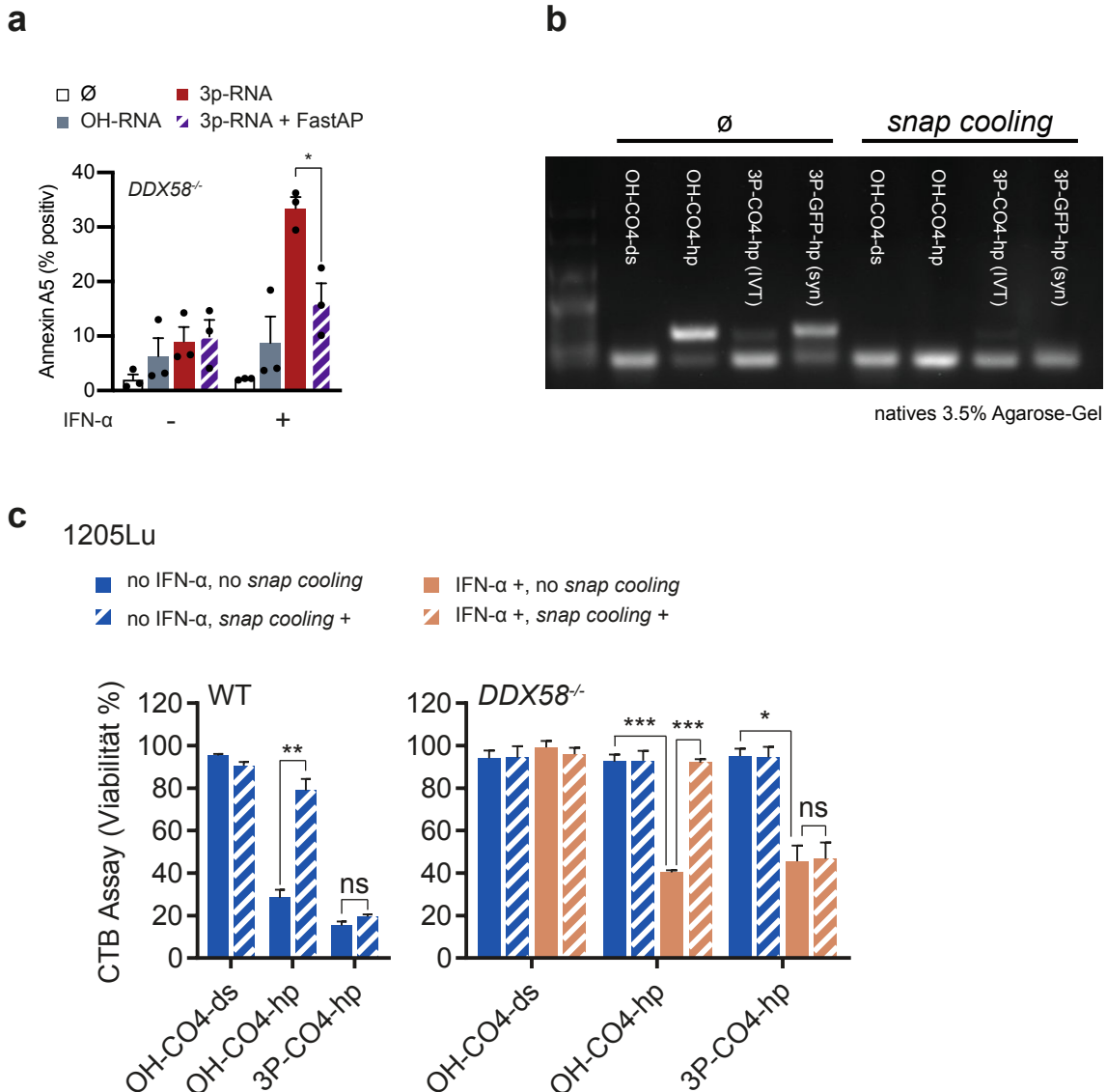


Abbildung 10: Die Induktion von Zelltod durch 3p-RNA ist abhängig von der 5'-Triphosphat-Gruppe und unabhängig von *hairpin*- oder instabilen Sekundärstrukturen

a 1205Lu *DDX58*^{-/-} Zellen wurden für 18 h mit IFN- α stimuliert und dann wie angegeben mit FastAP-behandelter bzw. -unbehandelter 3p-RNA oder Kontrollen transfiziert. Die Zelltodinduktion wurde 48 h nach der Transfektion per Durchflusszytometrie mittels Annexin A5-Assay gemessen. Der Mittelwert + SEM von drei unabhängigen Experimenten ist dargestellt. Die statistische Analyse erfolgte mittels t-Test.

b und **c** Die immunstimulierenden RNAs oder ihre Kontrollen wurden vor Durchführung der angegebenen Experimente mittels *snap-cooling* behandelt, um die Bildung von Sekundärstrukturen zu verhindern (siehe Material und Methoden). **b** Native 3.5 % Agarose-Gelelektrophorese von jeweils 1 μ g stimulierender RNA oder Kontrollen wie angegeben. IVT: RNA wurde mittels *in vitro* Transkription erzeugt, syn: RNA wurde chemisch synthetisiert. Ein repräsentatives Ergebnis von zwei unabhängigen Experimenten ist dargestellt. **c** 1205Lu WT oder *DDX58*^{-/-} Zellen wurden mit chemisch synthetisierten RNAs (160 nM) und/oder IFN- α (1000 U/ml für 18 h vor Transfektion) wie angezeigt stimuliert. Nach 48 h erfolgte die Messung der Viabilität mittels CTB-Assay. Der Mittelwert + SEM von drei unabhängigen Experimenten ist gezeigt. Die statistische Analyse erfolgte mittels t-Test (WT) oder *one-way* ANOVA (*DDX58*^{-/-}).

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

3.2.3 3p-RNA bindet spezifisch OAS1 und aktiviert RNase L

Um den Rezeptor, der für die Auslösung von Zelltod durch 3p-RNA verantwortlich ist, identifizieren zu können, sollten die zuvor erzielten Ergebnisse mit einem *proteomics*-basierten Ansatz kombiniert werden. Nachdem die Auslösung von Zelltod von der Vorstimulation mit IFN- α und der 5'-Triphosphat-Gruppe abhängig war (Abbildungen 4 d, e und 10 a), wurde eine Affinitätsreinigung von Proteinen aus IFN- α -vorstimulierten Lysaten mit Hilfe von biotinylierter 3p-RNA (3p-RNA-biot.) im Vergleich zu einer dephosphorylierten Kontrolle (OH-RNA-biot.) durchgeführt. Hierauf erfolgte eine massenspektrometrische Analyse mit LFQ. Nach Vergleich der 30 am stärksten durch IFN- α hochregulierten Gene mit RNA-Bindungsfunktion mit den in der LFQ angereicherten Proteinen, zeigten sich nur die Proteine RIG-I (Positivkontrolle) und OAS1 signifikant durch 3p-RNA-biot. im Vergleich zu OH-RNA-biot. angereichert (Abbildung 11 a).

Zur Bestätigung dieser Ergebnisse wurde eine *Western Blot*-Analyse von Proteinen, die wie oben beschrieben nach ihrer Affinität zu 3p-RNA-biot. im Vergleich zu OH-RNA-biot. gereinigt wurden, durchgeführt. Auch hier ließ sich die höhere Affinität von OAS1 zu 3p-RNA-biot. bestätigen (Abbildung 11 b). OAS3 zeigte keinen relevanten Unterschied der Bindungsaffinität in Bezug auf die 5'-Triphosphat-Gruppe, während PKR sogar (wie auch in der LFQ) stärker von OH-RNA-biot. gebunden wurde. Dies steht in Kontrast zu früheren Arbeiten, in denen eine 5'-Triphosphat-abhängige Bindung von PKR an RNA beschrieben wurde (Nallagatla *et al.*, 2007).

OAS1 synthetisiert nach Aktivierung durch RNA den *second messenger* 2-5A (Hovanessian *et al.*, 1977; Zilberstein *et al.*, 1978). 2-5A vermittelt darauf die Dimerisierung und damit Aktivierung von RNase L (Zhou, 1993; Dong & Silverman, 1997). Das zentrale Charakteristikum der Aktivierung von RNase L ist der Abbau viraler und zellulärer RNA, einschließlich ribosomaler RNA (rRNA) (Chakrabarti *et al.*, 2011; Han *et al.*, 2014).

Um zu testen, ob RNase L durch 3p-RNA-Behandlung aktiviert wird, wurde die Integrität der rRNA in RIG-I-defizienten 1205Lu und WT B16F10 Zellen mit und ohne vorheriger Stimulation mit IFN- α durch Kapillargelelektrophorese (Agilent Bioanalyzer) untersucht (Abbildungen 11 c und d). In 1205Lu *DDX58*^{-/-} Zellen führte nur die Transfektion von 3p-RNA in Kombination mit IFN- α -*priming* zum Abbau von rRNA (Abbildung 11 c), was darauf hinweist, dass RNase L erst nach IFN-I-abhängigem *priming* und Erkennung von 3p-RNA durch OAS aktiviert werden kann. Die Degradation von RNA durch Behandlung

mit 3p-RNA konnte in murinen B16F10-Zellen reproduziert werden (Abbildung 11 d), was für ein Spezies-übergreifendes Prinzip spricht.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass 3p-RNA im Vergleich zu anderen Proteinen aus der Gruppe der RNA-Rezeptoren mit direkter antiviraler Wirkung spezifisch OAS1 binden und darauf zelluläre RNA-Degradation, wahrscheinlich durch die Aktivierung von RNase L, ausgelöst werden kann.

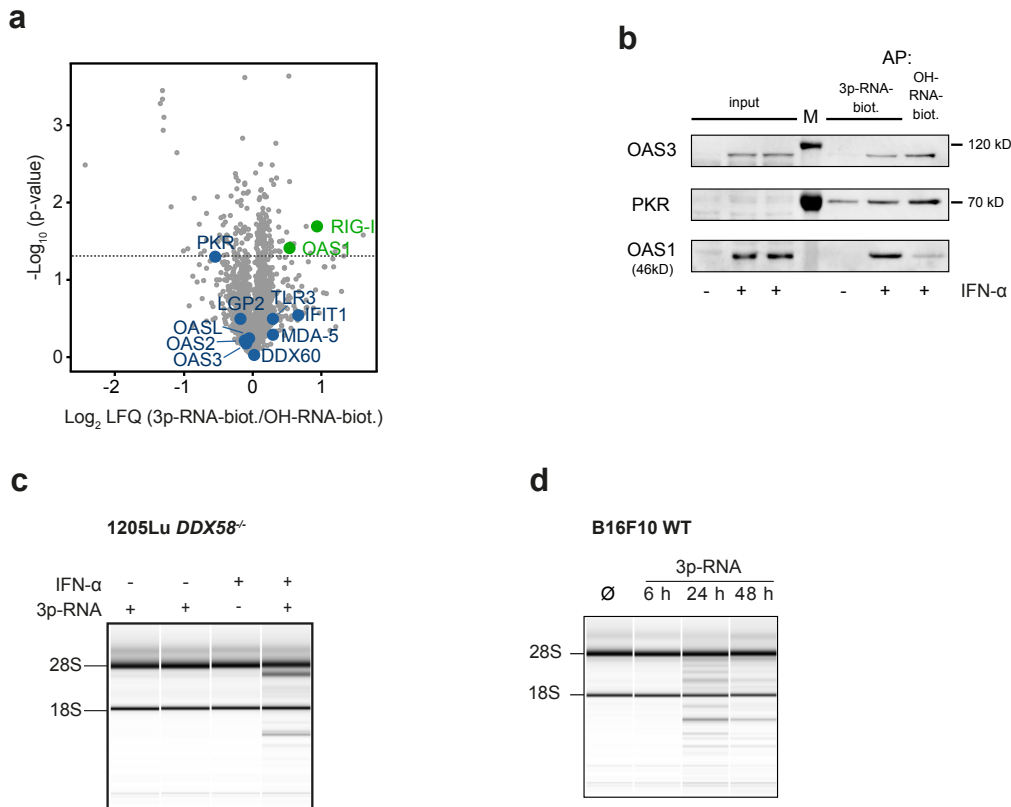


Abbildung 11: 3p-RNA bindet spezifisch OAS1 und aktiviert RNase L

a Volcano plot der *relative label-free quantification* (relativen markierungsfreien Quantifizierung, LFQ) von Proteinen, die an biotinylierte 3p-RNA (3p-RNA-Biot) im Vergleich zu FAST-AP-behandelter 3p-RNA-Biot. (OH-RNA-Biot.) gebunden sind. Die Proteine wurden nach ihrer Affinität zu RNA-gebundenen magnetischen Streptavidin-beads aus Lysaten von IFN- α -vorstimulierten Zellen gereinigt. Hierauf erfolgte die Identifizierung und Quantifizierung der angereicherten Proteine unter Verwendung von LC-MS / MS-Massenspektrometrie ($n = 5$) (durchgeführt durch Dr. Stephan Müller, DZNE, München; siehe Material und Methoden). Proteine, deren Gene mit der *gene ontology: molecular function* (GO: MF) „double-stranded RNA binding“ aus Abbildung 7 b annotiert waren sind blau, davon signifikant angereicherte sind grün hervorgehoben.

b Western-Blot-Validierung der Ergebnisse aus der Massenspektrometrie. 3p-RNA-Biot. oder OH-RNA-Biot. wurden an Streptavidin-beads gebunden und zur Affinitätsreinigung (AP) von Proteinen in Lysaten aus nicht stimulierten oder IFN- α -stimulierten (18 h) Zellen verwendet. Als Input wurden 30 μ g Proteinlysate verwendet. Die Membran wurde auf Anreicherung von OAS1, OAS3 und PKR untersucht. Ein repräsentatives Ergebnis von drei unabhängigen Experimenten ist dargestellt.

c und **d** rRNA-Integritätsanalyse der Gesamt-RNA, isoliert aus 1205Lu DDX58^{-/-} (**c**) oder B16F10 WT (**d**) Zellen, mittels Bioanalyzer. **c** 1205Lu DDX58^{-/-} Zellen wurden mit IFN- α (18 h), 3p-RNA (6 h) oder IFN- α , dann 3p-RNA behandelt. **d** B16F10 WT Zellen wurden für 6, 24 oder 48 h mit 3p-RNA (80 nM) behandelt. Ein repräsentatives Ergebnis von mindestens drei (**c**) oder zwei (**d**) unabhängigen Experimenten ist dargestellt.

3.2.4 Die Aktivität von RNase L vermittelt Zelltod durch 3p-RNA

Als nächstes sollte untersucht werden, ob die Aktivierung von RNase L kausal für den 3p-RNA-induzierten Zelltod ist. Hierfür wurden 1205Lu *RNASEL*^{-/-} und *DDX58*^{-/-} x *RNASEL*^{-/-} sowie B16F10 *Rnase1*^{-/-} und *Mavs*^{-/-} x *Rnase1*^{-/-} Zellen generiert. Zunächst erfolgte die Untersuchung der rRNA-Degradation (Abbildung 12 a): Die rRNA-Degradation in WT oder *DDX58*^{-/-} Zellen nach Stimulation mit 3p-RNA hing vollständig von der Anwesenheit von RNase L ab. Zudem zeigte sich, dass *RNASEL*^{-/-} Zellen resistent gegen 3p-RNA-induzierten Zelltod, insbesondere bei hohen RNA-Konzentrationen, waren (Abbildung 12 b, c).

Für die RNA-Degradationsprodukte, die durch die Aktivität von RNase L entstehen, wurde beschrieben, dass sie ihrerseits als Liganden von RIG-I die IFN-I Produktion steigern können (Malathi *et al.*, 2007). Somit war es ein denkbares Szenario, dass nicht nur die Effektor-, sondern auch die *priming*-Phase der Zelltodinduktion durch den KO von RNase L gehemmt werden können. Um zu untersuchen, ob die Resistenz von RNase L-defizienten Zellen auf einem defekten *priming* beruht, wurde erneut ein Kokulturaufbau untersucht: Hierzu wurden B16F10 WT, *Mavs*^{-/-}, *Rnase1*^{-/-} oder *Mavs*^{-/-} x *Rnase1*^{-/-} Zellen kokultiviert (Abbildung 12 d). Somit war ein gleichmäßiges *priming* auf allen Genotypen sichergestellt. Wie erwartet zeigten *Mavs*^{-/-} Zellen in der Kokultur keinen signifikanten Unterschied in der Zelltodinduktion im Vergleich zu WT Zellen, was auf ein effektives *priming* hinwies. *Rnase1*^{-/-} und *Mavs*^{-/-} x *Rnase1*^{-/-} Zellen hingegen zeigten eine signifikante Reduktion der Zelltodinduktion durch 3p-RNA.

Somit konnte RNase L als zentrales Protein in der Effektorphase des 3p-RNA-induzierten Zelltodes identifiziert werden.

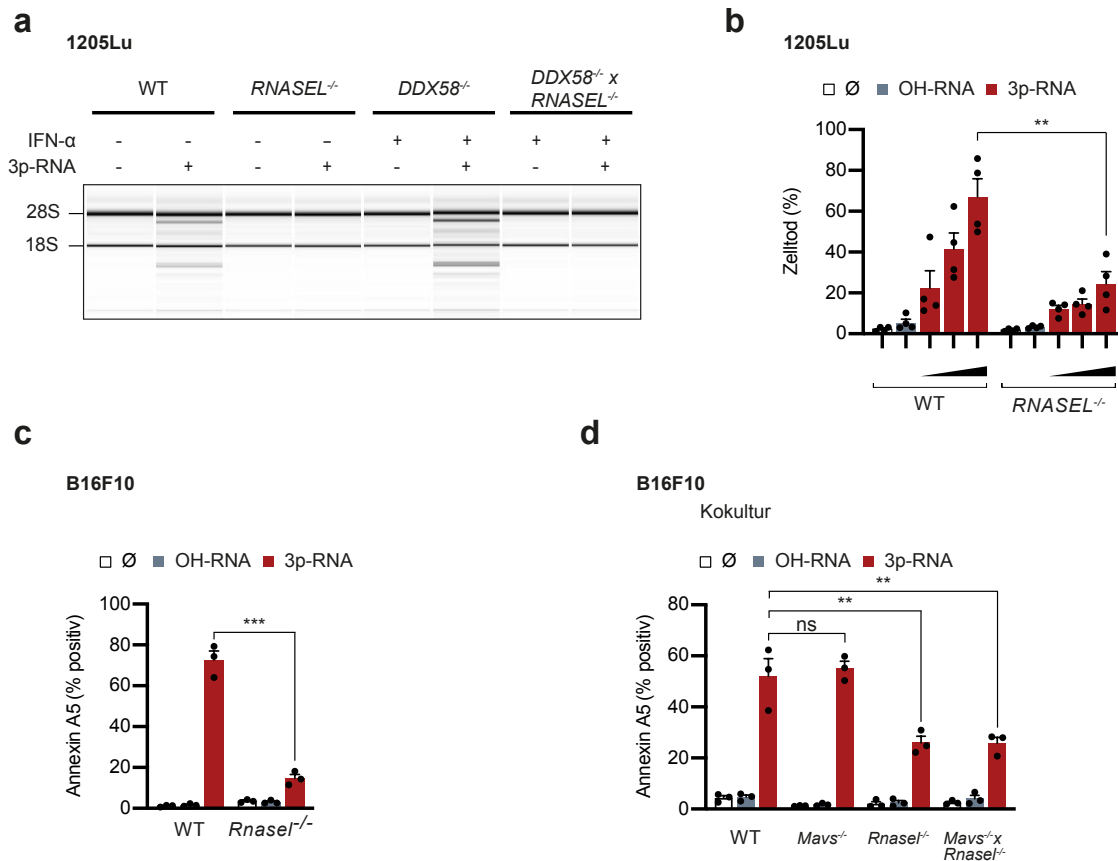


Abbildung 12: Die Aktivität von RNase L vermittelt Zelltod durch 3p-RNA

a Analyse der rRNA Degradation mittels Bioanalyzer von Gesamt-RNA, die nach einer Behandlung mit IFN-α (18 h), 3p-RNA (12 h) oder IFN-α (18 h), dann 3p-RNA (12 h) aus 1205Lu Zellen mit den angezeigten Genotypen isoliert worden ist. Ein repräsentatives Ergebnis von mindestens zwei unabhängigen Experimenten ist dargestellt.

b und **c** Die 3p-RNA-abhängige Induktion von Zelltod wurde 48 h nach Transfektion mittels Annexin A5 und *fixable viability dye*-Färbung (**b**) oder Annexin A5-Färbung (**c**) per Durchflusszytometrie in den angegebenen Zelllinien bestimmt. Es wurden 40, 80 und 160 nM (**b**) oder 80 nM (**c**) RNA zur Transfektion verwendet. Der Mittelwert + SEM von vier (**b**) bzw. drei (**c**) unabhängigen Experimenten ist dargestellt. Die statistische Analyse erfolgte mittels t-Test.

d B16F10 WT Zellen wurden mit den angegebenen KO Zelllinien kokultiviert. Die Messung des Zelltodes erfolgte mittels Annexin A5 Färbung per Durchflusszytometrie. Die statistische Analyse erfolgte mittels One-way ANOVA mit Tukey post-hoc Test.

ns: nicht signifikant, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

4. Diskussion

4.1 Zusammenfassung der experimentellen Ergebnisse und Folgedaten

Das Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Signalwege, die nach Erkennung des RIG-I-Liganden 3p-RNA durch das angeborene Immunsystem zur Auslösung von Zelltod führen. Zentrale Hypothese war, dass sich – anders als in der Literatur beschrieben – die Signalwege, die zur Ausschüttung von Zytokinen führen, auf molekularer Ebene von denen trennen lassen, die zur Induktion von Zelltod führen. Diese Hypothese konnte in Kokultorexperimenten von RIG-I-defizienten und WT Zellen bestätigt werden (Abbildung 4 b und c). Der zentrale Faktor, der RIG-I-defiziente Zellen für die Induktion von Zelltod durch 3p-RNA sensibilisierte, waren IFN-I (Abbildung 4 d und e). Der IFNAR-Signalweg war essentiell für die Sensibilisierung RIG-I-defizienter Zellen für Zelltod in der Kokultur mit WT Zellen und die Aktivität von IFN-I alleine reichte aus, um RIG-I- oder MAVS-defiziente Zellen für die Auslösung von Zelltod durch 3p-RNA zu *primen*. Somit musste es mindestens einen zweiten, IFN-I-induzierten Rezeptor für 3p-RNA geben, der in der Lage ist, 3p-RNA zu erkennen und Zelltod auszulösen. Nach Bestätigung dieser Ergebnisse im Kontext von Infektionen mit dem negativ-Strang RNA-Virus VSV (Abbildung 6) und der näheren Charakterisierung der ausgelösten Zelltodform als intrinsische Apoptose (Abbildung 7), sollte der für den RIG-I-unabhängigen Zelltod verantwortliche Rezeptor identifiziert werden. Hierzu wurde zunächst ein Ansatz verfolgt, der mittels RNA-seq eine Charakterisierung des Transkriptoms in *DDX58*^{-/-} Zellen nach Stimulation mit IFN-I und 3p-RNA vornahm (Abbildung 8). Zwar ließ sich bestätigen, dass die Veränderung des Transkriptoms durch 3p-RNA in *DDX58*^{-/-} Zellen streng von einer Vorstimulation mit IFN-I abhängt, jedoch konnten aus den Daten keine Rückschlüsse auf den Mechanismus der Zelltodinduktion abgeleitet werden.

Somit sollte der verantwortliche Rezeptor durch eine Kombination aus Affinitätsaufreinigung von 3p-RNA mit anschließender Massenspektrometrie und RNA-seq der in 1205Lu *DDX58*^{-/-} Zellen nach Stimulation mit IFN-I hochregulierten RNA-bindenden Proteine direkt untersucht werden. In der Tat konnte mit diesem Ansatz neben RIG-I, welches als Positivkontrolle angesehen werden kann, OAS1 als einziges, signifikant angereichertes Protein identifiziert werden (Abbildungen 10 sowie 11 a und b). Zudem konnte gezeigt werden, dass das unmittelbar *downstream* von OAS1

gelegene Protein RNase L nach Stimulation mit 3p-RNA aktiviert wird (Abbildung 11 c und d) und für die Zelltodinduktion durch 3p-RNA verantwortlich ist (Abbildung 12).

In Folgedaten, die während einer Post-Promotionsphase des Autors sowie in dem Promotionsprojekt von Simone Formisano gewonnen werden konnten, wurde der molekulare Mechanismus der Zelltodinduktion untersucht: Es konnte gezeigt werden, dass RNase L nach Stimulation mit 3p-RNA zu einem raschen Translationsarrest in Tumorzellen führt. Dieser Translationsarrest war entscheidend für die Depletion des anti-apoptotischen BCL-2 Proteins MCL-1 durch das pro-apoptotische BH3-*only* Protein Noxa, das bereits in früheren Arbeiten als wichtig für den RLR-induzierten Zelltod beschrieben worden war (Besch *et al.*, 2009; Tormo *et al.*, 2009; Matsushima-Miyagi *et al.*, 2012).

Somit lässt sich neben einigen anderen Signalwegen der angeborenen Immunität auch die Immunantwort auf 3p-RNA in zwei Phasen einteilen (Abbildung 13): Eine IFN-I-abhängige *priming*-Phase, in der die Proteine des Effektormechanismus hochreguliert werden und eine Effektorphase, in der die Auslösung des Zelltodsignals stattfindet.

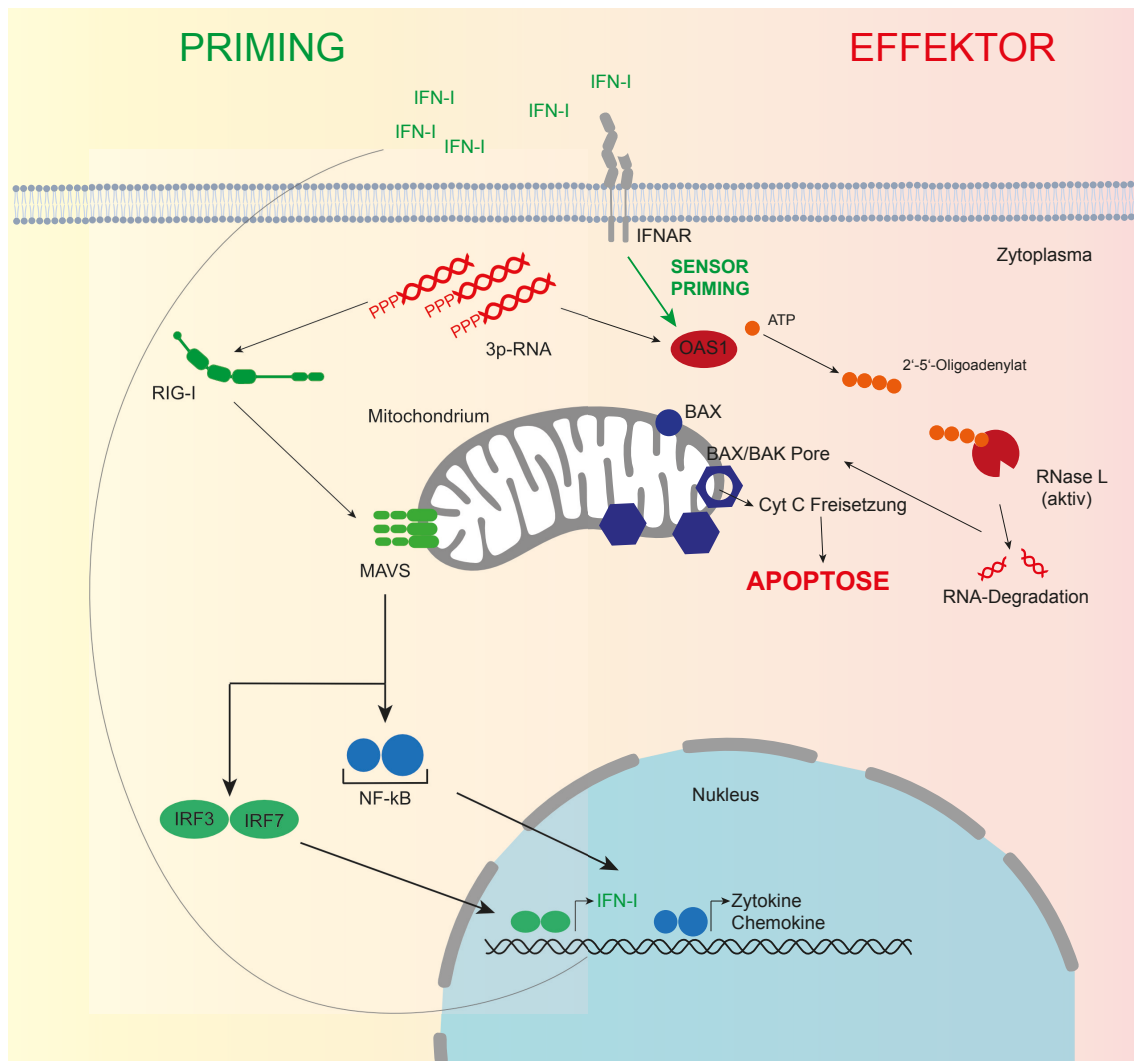


Abbildung 13: Übersichtsabbildung zu den zentralen Ergebnissen dieser Arbeit

3p-RNA wird im Zytosol durch RIG-I erkannt, wodurch es zur Induktion von IFN-I kommt. Das auto-/parakrine IFN-I Signal führt über IFNAR zur Hochregulation von OAS1 (*priming*-Phase), das wiederum in der Lage ist 3p-RNA zu erkennen und daraufhin über den *second messenger* 2'-5A RNase L zu aktivieren. RNase L vermittelt die Effektorphase der Induktion von intrinsischer Apoptose durch 3p-RNA.

4.2 Die Zelltodinduktion durch 3p-RNA erfolgt in einem zweistufigen Prozess

4.2.1 Die *priming*-Phase von 3p-RNA-abhängigem Zelltod wird durch RIG-I über IFN-I vermittelt

In früheren Arbeiten wurde gezeigt, dass der RIG-I-Ligand 3p-RNA Zelltod durch Effekte induziert, die direkt *downstream* des RIG-I Signalweges selbst liegen (Poeck *et al.*, 2008; Besch *et al.*, 2009; Ellermeier *et al.*, 2013; El Maadidi *et al.*, 2014; Chattopadhyay & Sen, 2017). Tatsächlich ließ sich die vollständige Abhängigkeit der Zelltodinduktion von einem intakten RIG-I- und MAVS-Signalweg auch in der vorliegenden Arbeit reproduzieren. Jedoch untersuchte keine der vorangegangenen Studien Zellen in einem antiviralen Zustand, wie er durch auto- und parakrine Signalschleifen in der Mikroumgebung von Virus-infizierten Zellen primär durch die Anwesenheit von IFN-I induziert wird. Daher konnten die hier beschriebenen *priming*- und Effektorphasen in bisher veröffentlichten Zellkulturexperimenten nicht unterschieden werden. Lee und Kollegen beobachteten nach Analyse einer Vielzahl von Sekundärstruktur-bildenden, einzelsträngigen RNA Molekülen, dass die Induktion von Zytokinen und Zelltod voneinander entkoppelt werden können. Die zugrundeliegenden Mechanismen jedoch wurden keiner sekundären Rezeptorfamilie zugeordnet (Lee *et al.*, 2017).

Es gibt widersprüchliche Berichte über die Rolle von IFN-I bei durch RLR-Liganden vermitteltem Zelltod (Besch *et al.*, 2009; Kumar *et al.*, 2015). In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Inhibition des IFN-I-Signalweges vorrangig durch genetische Inaktivierung mittels CRISPR-Cas9, während die bisher veröffentlichten Studien sich häufig auf die siRNA-vermittelte Hemmung von Komponenten des Signalweges stützten. Die Untersuchung von Signalwegen der RNA Erkennung mittels siRNA birgt gewisse technische Probleme: Erstens kann es durch die Erkennung der siRNA selbst als fremd zu einer unspezifischen, basalen Aktivierung von PRR-Signalwegen und damit einer Induktion von IFN-I mit Hochregulation von ISGs kommen. Zweitens kann es beim Einsatz von siRNA zu sogenannten *off-target* Effekten durch Inhibition von mRNAs mit teilweise ähnlicher Sequenz kommen. Drittens reicht die Effizienz des *Knockdown* meist nicht für eine vollständige Inhibition des Signalweges auf Einzelzellebene. Dies bedeutet, dass jede einzelne Zelle trotz einer auf die Gesamtpopulation ausgeprägten Inhibition der Gen-/Proteinexpression eine gewisse Kompetenz für den Signalweg behält, vor allem vor dem Hintergrund einer gegenläufigen Induktion der Zielgene durch

IFN-I-Stimulation. Diese Effekte könnten die divergierenden Befunde in der Literatur und den hier mittels genetischer Inhibition erzielten Ergebnissen ganz oder teilweise erklären.

In früheren Veröffentlichungen wurde eine von der Transkription unabhängige Rolle von IRF3 in der Induktion von intrinsischer Apoptose sowohl für den RLR als auch für den cGAS-STING Signalweg beschrieben (Chattopadhyay *et al.*, 2010, 2016; Zierhut *et al.*, 2019). Im Gegensatz hierzu ergab sich in der vorliegenden Arbeit, dass IRF3 zwar für das *priming* von Zelltod durch RIG-I notwendig ist, diese Funktion aber durch die Hinzugabe von IFN-I vollständig ersetzt werden kann. Somit fand sich in dieser Arbeit kein Hinweis auf eine Involvierung von IRF3 in der Effektorphase des Zelltodes. Das Fehlen einer Unterscheidung zwischen *priming*- und Effektormechanismen hat in der Vergangenheit möglicherweise eine Interpretation gemäß dem hier vorgeschlagenen Modell verhindert. Hinzu kommt ein technischer Aspekt, der in einigen Studien zu RIPA nicht berücksichtigt und von Wenzel und Kollegen bereits in einer Studie zu Zelltod durch doppelsträngige DNA herausgestellt wurde (Wenzel *et al.*, 2012). Sowohl die shRNA als auch die KO-Maus für IRF3, die für die Studien zu RIPA verwendet wurden, zeigten eine gleichzeitige Inhibition des antiapoptotischen BCL2 Proteins *Bcl-2-like protein 12* (BCL2L12). Die Gruppe, die ursprünglich die *Irf3* KO-Maus generiert hatte (Sato *et al.*, 2000) berichtete später, dass es sich hierbei um eine *Irf3*^{-/-} x *Bcl2l12*^{-/-} Maus handelt und konnte zeigen, dass die Resistenz gegenüber Zelltod durch das DNA Analogon *polydeoxyadenylic:deoxythymidylic acid* (poly (dA:dT)) von BCL2L12 und nicht IRF3 vermittelt ist (Nakajima *et al.*, 2009). Die gleiche Gruppe hat inzwischen eine *Irf3*^{-/-} Maus generiert, die *Bcl2l12* intakt lässt (Yanai *et al.*, 2018). Vor diesem Hintergrund ist eine Neubewertung der veröffentlichten Studien sowie neue Untersuchungen – insbesondere in den nun vorhandenen Modellen in der Maus – von großer Bedeutung.

Ein weiterer experimenteller Befund, der gegen eine direkte Involvierung von *downstream* gelegenen Komponenten des RLR-Signalweges selbst in der Zelltodinduktion spricht, ist die Konvergenz verschiedener PRR-Signalwege, die keinen Zelltod auslösen, auf diese Komponenten. So wirkt beispielsweise die Stimulation von TLR3, TLR7 oder TLR8 in den meisten Zelltypen ohne gleichzeitige Inhibition bestimmter Signalwegkomponenten (insbesondere Caspase 8) nicht zytotoxisch (Fitzgerald & Kagan, 2020), jedoch führen sie alle – wie auch RIG-I und MDA5 – zu einer Aktivierung von IRF3 oder IRF7 bzw. den Transkriptionsfaktoren des NF-κB-Signalweges.

Die mit der Literatur divergierenden Ergebnisse könnten zusätzlich durch Spezies- oder Zelltyp-spezifische Effekte verursacht sein. Ein entscheidender Unterschied könnte

zwischen Krebszelllinien und nicht maligne-transformierten Zelllinien bestehen (siehe Kapitel 4.4.2). Zudem zeigen manchen Zelllinien eine basale IFN-I-Signatur, die zur Hochregulation diverser ISGs in diesen Zelllinien beiträgt und damit die Notwendigkeit von *priming* in diesen Zelllinien umgehen könnte (Liu *et al.*, 2019).

4.2.2 RNase L als Effektor von RNA-induziertem Zelltod

Die antivirale Aktivität von RNase L ist schon früh mit programmiertem Zelltod in Verbindung gebracht worden (Zhou, 1997), wobei der Mechanismus der Zelltodauslösung bisher nicht eindeutig geklärt wurde. In kürzlich erschienenen Arbeiten konnte RNase L nicht nur als Effektor von Zelltod durch das doppelsträngige RNA-Analogon Poly(I:C), sondern auch als verantwortlich für die Letalität des KO von *double-stranded RNA-specific adenosine deaminase* (ADAR1) identifiziert werden (Li *et al.*, 2017), dessen Funktionsverlust zu einer Akkumulation endogener, immunstimulatorischer RNAs führt (Ahmad *et al.*, 2018). Interessanterweise war der Zelltod durch den KO von ADAR1 in einigen anderen Arbeiten von der Aktivität von PKR abhängig (Chung *et al.*, 2018; Ishizuka *et al.*, 2019; Liu *et al.*, 2019), so dass es auch hier wohl Zelltyp- oder Spezies-spezifische Unterschiede gibt. Den Arbeiten gemeinsam ist jedoch, dass die initiale Erkennung der RNA über MDA5 (*priming*) nicht für die Auslösung des Zelltodes verantwortlich ist. Dies spricht dafür, dass es sich bei der Aufteilung der Immunantwort auf intrazelluläre RNA in eine *priming*-Phase und eine Effektorphase um ein übergeordnetes Prinzip der angeborenen Immunität handelt.

Der molekulare Mechanismus der RNase L-induzierten Apoptose durch 3p-RNA ist in nachfolgenden Projekten der Gruppe behandelt worden. Als entscheidend stellte sich der Translationsarrest heraus, der durch die Aktivität von RNase L ausgelöst wird. Dieser Translationsarrest wird mutmaßlich durch die rasche Degradation von mRNAs und weniger durch die Degradation von rRNA oder tRNA – wie zwischenzeitlich postuliert (Donovan *et al.*, 2017) – ausgelöst. Zwei kürzlich erschienene Arbeiten konnten zeigen, dass RNase L-abhängiger Translationsarrest eine gewisse Selektivität besitzt (Burke *et al.*, 2019; Rath *et al.*, 2019). Antivirale mRNAs wie *IFNB1* oder *IL6* zeigten eine Resistenz gegenüber der Degradation durch RNase L, was mutmaßlich eine effektive antivirale Genexpression bei gleichzeitiger Inhibition der Translation von Virusproteinen ermöglicht. Eine interessante Frage ist somit, ob eine Involvierung dieser selektiven mRNA Degradation auch in der Induktion von intrinsischer Apoptose durch 3p-RNA eine Rolle spielt.

Ferner erscheint erwähnenswert, dass sowohl die Aktivierung von PKR als auch von IFIT1 ebenso zu Translationsarrest führt und insbesondere PKR mit Zelltod durch doppelsträngige RNA in Verbindung gebracht worden ist. Möglicherweise ist die Auslösung von Translationsarrest durch RNA-Rezeptoren mit direkter antiviraler Wirkung nach deren *priming* durch PRRs der gemeinsame Nenner der antiviralen Zelltodinduktion.

Das Wissen, dass es nach Stimulation von RIG-I-defizienten Zellen mit IFN-I und 3p-RNA zur Aktivierung von RNase L kommt, ermöglicht auch eine Neubewertung der Transkriptomdaten aus Abbildung 8. Die vermeintlich transkriptionelle Signatur, die hier keinem bekannten PRR-Signalweg zugeordnet werden konnte, entspricht vermutlich weniger einer Änderung der Transkription als vielmehr der differentiellen mRNA-Degradation durch RNase L in Zellen, in denen keine PRR-Aktivierung stattfindet (RIG-I KO). Eine vergleichende Analyse dieser Daten mit den Daten von Burke und Kollegen sowie Rath und Kollegen (Burke *et al.*, 2019; Rath *et al.*, 2019) ermöglicht unter Umständen eine genaue Charakterisierung der differentiellen mRNA-Degradation durch RNase L und die damit verbundene Änderung der Genexpression.

4.3 3p-RNA als neuartiger Ligand von OAS1

Ein kombinierter Ansatz aus Affinitätsreinigung von 3p-RNA gefolgt von Massenspektrometrie und RNA-seq ergab, dass von allen bekannten RNA-bindenden Proteinen neben RIG-I selbst nur OAS1 eine signifikant höhere Affinität zu 3p-RNA aufweist als die dephosphorylierte Kontroll-RNA. Die Proteine der OAS-Familie enthalten vier Mitglieder: OAS1, OAS2, OAS3 und OASL, wobei OASL keine 2-5A-Synthetase-Aktivität besitzt (Hornung *et al.*, 2014). OAS1 bindet relativ kurze doppelsträngige RNA mit mindestens 17 bp (Donovan *et al.*, 2013), OAS2 benötigt mindestens 34 bp und OAS3 bindet bevorzugt RNA länger als 50 bp (Donovan *et al.*, 2015). Trotz nicht unerheblicher Bemühungen sind die *in vivo*-Liganden der OAS-Proteine schlecht charakterisiert. Li und Kollegen berichteten anhand A549-Zellen, dass OAS3 der hauptsächliche Sensor für das doppelsträngige RNA-Analogon Poly(I:C) sowie RNAs ist, die während der Infektion mit verschiedenen Viren entstehen (Li *et al.*, 2016).

Während die in der vorliegenden Arbeit verwendete 3p-RNA mit 19 bp plus *loop* in die Längenpräferenz von OAS1 passt, war die Bindung der RNA an OAS1 zusätzlich von der 5'-Triphosphat-Modifikation abhängig. Diese Voraussetzung ist für OAS1-Liganden bisher nicht eindeutig beschrieben. Meng und Kollegen fanden eine erhöhte OAS1-Aktivität der *viral associated RNA* (VA RNA), die während der Replikation von Adenoviren auftritt, wenn diese über eine 5'-Triphosphat-Modifikation im Vergleich zu einem 5'-Monophosphat oder keiner Phosphorylierung verfügte (Meng *et al.*, 2012). Vachon und Kollegen hingegen fanden Aktivitätsunterschiede durch eine 5'-Triphosphat-Modifikation nur in Kombination mit einer 2'-O-Methylierung und einem einzelsträngigen 3'-Pyrimidin Überhang (3'-ssPy) der verwendeten RNA, nicht jedoch nur in Kombination mit einer 3'-ssPy Modifikation (Vachon *et al.*, 2015). Es erscheint somit nicht unwahrscheinlich, dass neben ihrer Länge weitere strukturelle Eigenschaften einer immunstimulatorischen RNA mit ihrer „Erkennbarkeit“ durch eine 5'-Triphosphat-Modifikation interagieren und diese verstärken können.

Ferner muss berücksichtigt werden, dass in der vorliegenden Arbeit vorrangig die verstärkte Bindung von 3p-RNA an OAS1 im Vergleich zu einer dephosphorylierten Kontrolle gezeigt wurde. Während die Induktion von 3p-RNA-abhängiger zellulärer RNA-Degradation stark darauf hindeutet, kann nur die Untersuchung der OAS1-Aktivierung durch verschiedene RNAs *in vitro* eindeutig zeigen, dass auch die Aktivierung von OAS1 durch eine 5'-Triphosphat-Modifikation verbessert wird.

Weitere Untersuchungen sind nötig, um die genauen, molekularen Eigenschaften zu definieren, die eine immunstimulatorische RNA haben muss, um den RIG-I- und/oder den OAS1/RNase L-Signalweg zu aktivieren. Hierdurch wäre von Seite des eingesetzten Liganden eine Trennung von Zytokin- und Zelltodinduktion möglich.

4.4 Translationale Implikationen für Viruserkrankungen und die Immuntherapie von Tumoren mit RIG-I-Liganden

4.4.1 Potentielle Bedeutung für Viruserkrankungen am Beispiel von COVID-19

Im Dezember 2019 traten in Wuhan, China die ersten Fälle der durch das neue Coronavirus *severe acute respiratory syndrome coronavirus 2* (SARS-CoV-2) ausgelösten Erkrankung *Coronavirus disease 2019* (COVID-19) einer Lungenentzündung mit Entwicklung schwerer Fälle eines *acute respiratory distress syndrome* (ARDS) auf, dessen weltweite Ausbreitung zu einer für die Nachkriegsgeschichte beispiellosen Pandemie geführt hat (Rothan & Byrareddy, 2020). Die immense, weltweite Anstrengung COVID-19 zu verstehen, um Therapieansätze zu entwickeln, hat zu einem innerhalb kurzer Zeit außerordentlichen Verständnis der Pathophysiologie dieser Erkrankung geführt.

Schon früh wurde die Entwicklung eines Zytokinsturms – die massive Freisetzung proinflammatorischer Zytokine, durch Mechanismen der angeborenen Immunantwort – als zentrale Komponente einer schweren Erkrankung an COVID-19 verstanden (Mehta *et al.*, 2020). Wie andere Coronaviren, bei denen es sich um Positivstrang-RNA-Viren handelt (Gorbalenya *et al.*, 2020), wird SARS-CoV-2 neben TLR3 vermutlich auch durch die RLRs MDA5 und RIG-I erkannt (Kouwaki *et al.*, 2020).

Interessanterweise scheint die Rolle der IFN-I in der antiviralen Immunantwort auf SARS-CoV-2 zweiseitig zu sein: Auf der einen Seite zeigen Patienten mit Immundefekten in Proteinen, die eng mit der Induktion bzw. dem IFNAR-Signalweg verknüpft sind, oder Autoantikörpern gegen IFN-I vermehrt schwere Verläufe von COVID-19 (Bastard *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2020). Eine eingeschränkte IFN-I-Immunantwort korrelierte zudem in zwei Studien mit einem schweren Verlauf (Blanco-Melo *et al.*, 2020; Hadjadj *et al.*, 2020). Jedoch scheint eine verzögerte, persistierende, ausgeprägte Induktion von IFN-I ebenso mit schweren Krankheitsverläufen zu korrelieren (Lee *et al.*, 2020; Lucas *et al.*, 2020). Eine weitere Studie konnte zeigen, dass es bei der Lungenschädigung durch COVID-19 zu einem zweistufigen Prozess kommt (Desai *et al.*, 2020): Eine erste Phase, die durch hohe pulmonale Viruslast mit Induktion von IFN-I und diffuser Alveolarschädigung gekennzeichnet ist, sowie eine zweite Phase, in der es zu Wundheilungsprozessen und beginnenden Lungenfibrosierung kommt.

Kürzlich konnten in einer Genom-weiten Assoziationsstudie OAS1-Varianten identifiziert werden, die hochsignifikant mit schweren Verläufen von COVID-19 korrelieren (Pairo-Castineira *et al.*, 2020). Vor dem Hintergrund der Daten dieser Arbeit möchte man

spekulieren, dass der OAS1-medierte Zelltod ebenso eine zentrale Rolle in der Pathogenese von COVID-19 spielt. Möglicherweise ist OAS1 an dem diffusen Alveolarschaden durch Apoptose der Lungenepithelien beteiligt und die Inhibition der OAS1-abhängigen Apoptose könnte eine Therapiemöglichkeit bei schweren COVID-19 Verläufen darstellen. Auf der anderen Seite könnte die Aktivierung von OAS1/RNase L die Virusreplikation durch die rechtzeitige Auslösung von Zelltod limitieren.

Es wird spannend zu sehen, ob – und wenn ja zu welchem Zeitpunkt – eine Aktivierung von RNase L in Patienten mit COVID-19 oder anderen Viruserkrankungen stattfindet und ob die Stärke dieser Aktivierung positiv oder negativ mit der Krankheitsschwere korreliert. Dies gibt womöglich auch weitere Einblicke in die komplexen zellulären Entscheidungsprozesse für oder gegen programmierten Zelltod einer Virus-infizierten Zelle. Es erscheint nicht unwahrscheinlich, dass die konsekutive Aktivierung von RIG-I mit der darauffolgenden auto-/parakrinen IFN-I-abhängigen Hochregulation und Aktivierung von OAS1 maßgeblich zu dieser Entscheidung beiträgt: Die RIG-I Aktivierung selbst führt nicht zu Zelltod, jedoch wird die Zelle und das umliegende Mikromilieu für die rasche Auslösung von Zelltod vorbereitet. Im Falle einer ausbleibenden Beseitigung beziehungsweise einer zunehmenden Akkumulation des PAMPs (3p-RNA) würde es somit zur OAS1 Aktivierung mit rascher Auslösung von Apoptose zur Limitierung der Virusreplikation kommen. Unterschiedliche Affinitäten der Rezeptoren RIG-I und OAS1 für 3p-RNA könnten diese Entscheidung weiter modulieren. Diese Hypothese könnte die Grundlage für weitere Untersuchungen der Rezeptor-Liganden Interaktion von RIG-I, OAS1 und 3p-RNA bilden.

4.4.2 Anwendung in der Immuntherapie von Tumoren

Die Erkenntnis, dass die Zelltodinduktion durch 3p-RNA in ihrer Effektorphase von RIG-I unabhängig ist, hat potentiell auch Konsequenzen für das Design von RIG-I-Liganden für die Immuntherapie von Tumoren.

RIG-I-Liganden besitzen großes Potential für die Immuntherapie von Tumoren wie in zahlreichen Tumorentitäten in präklinischen Modellen gezeigt werden konnte (Poeck *et al.*, 2008; Besch *et al.*, 2009; Ellermeier *et al.*, 2013; Duewell *et al.*, 2015; Elion *et al.*, 2018; Heidegger, Wintges, *et al.*, 2019; Helms *et al.*, 2019; Ruzicka *et al.*, 2020; Such *et al.*, 2020). Die Erkenntnis, dass die Induktion von Zytokinen und Zelltod, die durch RIG-I-Liganden ausgelöst wird, von zwei unterschiedlichen Signalwegen abhängig ist, ermöglicht diese Signalwege spezifisch therapeutisch zu adressieren. Stimulatorische

RNAs könnten so gestaltet werden, dass sie OAS1 noch potenter aktivieren als die in dieser Arbeit verwendete 3p-RNA. Beispielsweise sind RNAs mit einem einzelsträngigen Pyrimidin am 3'-Ende der RNA potente Liganden für OAS1 (Vachon *et al.*, 2015). Somit kann durch entsprechende Modifikation einer 3p-RNA unter Umständen der Zelltodeffekt in Tumorzellen noch verstärkt und damit die anti-tumorale Wirkung durch vermehrte Auslösung von immunogenem Zelltod durch 3p-RNA verbessert werden.

Eng verknüpft mit dieser Frage ist, ob die Aktivierbarkeit des OAS1/RNase L Systems in Tumorzellen im Vergleich zu nicht maligne-transformierten Zelllinien unterschiedlich ist und ob dies therapeutisch ausgenutzt werden kann. In der ersten Veröffentlichung, die 3p-RNA-induzierte Apoptose in humanen Melanomzelllinien beschreibt, berichten Besch und Kollegen, dass diese Zellen im Vergleich zu primären Melanozyten oder Keratinozyten empfindlicher gegenüber Apoptose sind (Besch *et al.*, 2009). Während sie keinen Defekt in der Induktion von IFN-I oder den BH3-*only*-Proteinen Noxa oder PUMA fanden (was darauf hindeutet, dass der RIG-I-Signalweg selbst vergleichbar funktioniert), stellten sie fest, dass die fehlende Hochregulation von Bcl-xL in Melanomzellen der Mechanismus ist, der diesen Unterschied in der Empfindlichkeit gegenüber 3p-RNA verursacht. Ferner ist bekannt, dass maligne transformierte Zellen häufig eine deutlich höhere Sensitivität gegenüber pro-apoptotischen Stimuli (z.B. Chemotherapie) aufweisen (sogenanntes „*mitochondrial priming*“, Ryan *et al.*, 2010; Chonghaile *et al.*, 2011). Dies könnte zu der beobachteten erhöhten Sensibilität von Melanomzellen gegenüber 3p-RNA-induzierter Apoptose im Vergleich mit Melanozyten oder Keratinozyten beitragen.

Es ist plausibel, dass ähnliche Mechanismen primäre Immunzellen vor 3p-RNA-ausgelöster Apoptose schützen könnten und dass der durch RNase L-ausgelöste Arrest der Translation der Grund für die fehlende Hochregulation von Bcl-xL sein könnte. Dies würde darauf hinweisen, dass die Aktivierbarkeit des OAS1-RNase L-Weges je nach Zelltyp unterschiedlich ist. In einem Kooperationsprojekt mit PD Dr. Fabian Hauck (Kinderklinik und Kinderpoliklinik im Dr. von Haunerschen Kinderspital, LMU Klinikum) konnte festgestellt werden, dass primäre menschliche T-Zellen (im Vergleich zu B-Zellen oder Monozyten) RNase L bei Überexpression von natürlich auftretenden OAS1 *gain-of-function*-Varianten nicht aktivieren können (Magg *et al.*, Manuskript in Vorbereitung). Der Mechanismus dieses Unterschieds in der Aktivierbarkeit von RNase L und ob dies für die Tumorimmuntherapie genutzt werden kann, wird ein wichtiger Aspekt zukünftiger Forschung sein.

Die Kenntnis der molekularen Grundlage des Zelltodsignalweges ermöglicht zudem die Beantwortung einer noch grundsätzlicheren Frage in der Anwendung von 3p-RNA in der Immuntherapie von Tumoren: Wie wichtig ist die Auslösung von Tumorzelltod für die 3p-RNA-basierte Immuntherapie? Studien im Melanom und Pankreaskarzinom konnten zeigen, dass mit 3p-RNA behandelte, apoptotische Tumorzellen ein potentes, antitumorales Vakzin darstellen (Duewell *et al.*, 2014; Bek *et al.*, 2019). Zudem zeigten Caspase 3-defiziente Tumorzellen kein Ansprechen auf eine Therapie mit 3p-RNA in einem Melanom-Modell (Heidegger, Wintges, *et al.*, 2019). Interessanterweise war die tumorzellintrinsische Expression von RIG-I und MAVS in einigen Arbeiten nicht oder nur von untergeordneter Relevanz für die Effektivität RLR-basierter Immuntherapien, während die Funktionalität des RIG-I-Signalweges in Immunzellen kritisch war (Bald *et al.*, 2014; Heidegger, Kreppel, *et al.*, 2019; Heidegger, Wintges, *et al.*, 2019). Eine Inhibition von Zelltod in Tumorzellen durch KO von weit *downstream* gelegenen Komponenten des Signalweges wie z.B. BAX, BAK oder Caspase 3 kann auch andere Aspekte der 3p-RNA-basierten Immuntherapie wie die Auslösung extrinsischer Apoptose durch Effektorzellen des Immunsystems verhindern. Die Untersuchung von RNase L-defizienten Tumorzellen hingegen ermöglicht erstmalig die eindeutige Beantwortung der Frage der Notwendigkeit von 3p-RNA-induziertem Tumorzelltod für eine erfolgreiche Immuntherapie. Ferner bietet die Frage, inwieweit die Immunogenität der RIG-I-basierten Immuntherapie durch RNase L beeinflusst wird, Potenzial für hochinteressante zukünftige Untersuchungen.

5. Zusammenfassung

Doppelsträngige RNA wird im Zytoplasma nahezu aller Zellen von RIG-I-*like*-Rezeptoren (RLR) erkannt, was zur Induktion von Typ-I-Interferonen (IFN-I), proinflammatorischen Zytokinen und Apoptose führt. In der vorliegenden Arbeit wurden die molekularen Mechanismen, die bei Stimulation mit dem RIG-I-Liganden 5'-Triphosphat-RNA (3p-RNA) in Tumorzellen zur Zytokinsekretion und Zelltodinduktion führen, untersucht.

Sowohl Zelltod- als auch Zytokininduktion sind von RIG-I und seinem Adapterprotein *mitochondrial antiviral signaling protein* (MAVS) abhängig. Zelltod jedoch konnte auch in Abwesenheit von RIG-I nach einem IFN-I-abhängigen *priming* ausgelöst werden. Dies ließ sich sowohl für synthetische als auch natürliche Liganden von RIG-I zeigen.

Eine Kombination aus Analyse des Transkriptoms mittels RNA-Sequenzierung und der Affinitätsreinigung von biotinylierter 3p-RNA, gefolgt von Massenspektrometrie, ergab, dass 3p-RNA die *oligoadenylatsynthetase 1* (OAS1) und damit *2-5A-dependent ribonuclease* (RNase L) aktiviert.

Im Gegensatz zu der vorherrschenden Meinung in der derzeitigen wissenschaftlichen Literatur zeigen diese Ergebnisse zum ersten mal, dass 3p-RNA-induzierte Apoptose ein zweistufiger Prozess ist, der aus einer RIG-I-abhängigen *priming*-Phase und einer OAS1/RNase L-abhängigen Effektorphase besteht. 3p-RNA konnte als neuer Ligand von OAS1 identifiziert werden. Diese Ergebnisse haben möglicherweise Implikationen für das Verständnis und die Behandlung von Viruserkrankungen wie COVID-19 sowie die Behandlung von Tumorerkrankungen mit synthetischer 3p-RNA.

6. Literaturverzeichnis

- Aballay, A. & Ausubel, F.M. (2001) Programmed cell death mediated by ced-3 and ced-4 protects *Caenorhabditis elegans* from *Salmonella typhimurium*-mediated killing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **98**, 2735–2739.
- Ahmad, S., Mu, X., Yang, F., Greenwald, E., Park, J.W., Jacob, E., Zhang, C.-Z., & Hur, S. (2018) Breaching self-tolerance to alu duplex RNA underlies MDA5-mediated inflammation. *Cell*, **172**, 797–810.e13.
- Bald, T., Landsberg, J., Lopez-Ramos, D., Renn, M., Glodde, N., Jansen, P., Gaffal, E., Steitz, J., Tolba, R., Kalinke, U., Limmer, A., Jönsson, G., Hölzel, M., & Tüting, T. (2014) Immune cell-poor melanomas benefit from PD-1 blockade after targeted type I IFN activation. *Cancer Discov.*, **4**, 674–687.
- Barbalat, R., Ewald, S.E., Mouchess, M.L., & Barton, G.M. (2011) Nucleic acid recognition by the innate immune system. *Annu. Rev. Immunol.*, **29**, 185–214.
- Bartok, E. & Hartmann, G. (2020) Immune sensing mechanisms that discriminate self from altered self and foreign nucleic acids. *Immunity*, **53**, 54–77.
- Bastard, P., Rosen, L.B., Zhang, Q., Michailidis, E., Hoffmann, H.-H., Zhang, Y., Dorgham, K., Philippot, Q., Rosain, J., Béziat, V., Manry, J., Shaw, E., Haljasmägi, L., Peterson, P., Lorenzo, L., Bizien, L., Trouillet-Assant, S., Dobbs, K., de Jesus, A.A., Belot, A., Kallaste, A., Catherinot, E., Tandjaoui-Lambiotte, Y., Le Pen, J., Kerner, G., Bigio, B., Seeleuthner, Y., Yang, R., Bolze, A., Spaan, A.N., Delmonte, O.M., Abers, M.S., Aiuti, A., Casari, G., Lampasona, V., Piemonti, L., Ciceri, F., Bilguvar, K., Lifton, R.P., Vasse, M., Smadja, D.M., Migaud, M., Hadjadj, J., Terrier, B., Duffy, D., Quintana-Murci, L., van de Beek, D., Roussel, L., Vinh, D.C., Tangye, S.G., Haerynck, F., Dalmau, D., Martinez-Picado, J., Brodin, P., Nussenzweig, M.C., Boisson-Dupuis, S., Rodríguez-Gallego, C., Vogt, G., Mogensen, T.H., Oler, A.J., Gu, J., Burbelo, P.D., Cohen, J.I., Biondi, A., Bettini, L.R., D'Angio, M., Bonfanti, P., Rossignol, P., Mayaux, J., Rieux-Laucat, F., Husebye, E.S., Fusco, F., Ursini, M.V., Imberti, L., Sottini, A., Paghera, S., Quiros-Roldan, E., Rossi, C., Castagnoli, R., Montagna, D., Licari, A., Marseglia, G.L., Duval, X., Ghosn, J., Tsang, J.S., Goldbach-Mansky, R., Kisand, K., Lionakis, M.S., Puel, A., Zhang, S.-Y., Holland, S.M., Gorocho, G., Jouanguy, E., Rice, C.M., Cobat, A., Notarangelo, L.D., Abel, L., Su, H.C., & Casanova, J.-L. (2020) Autoantibodies against type I IFNs in patients with life-threatening COVID-19. *Science*, **370**, eabd4585.
- Bauernfried, S., Scherr, M.J., Pichlmair, A., Duderstadt, K.E., & Hornung, V. (2020) Human NLRP1 is a sensor for double-stranded RNA. *Science*, **5**, eabd0811.
- Bek, S., Stritzke, F., Wintges, A., Nedelko, T., Böhmer, D.F.R., Fischer, J.C., Haas, T., Poeck, H., & Heidegger, S. (2019) Targeting intrinsic RIG-I signaling turns melanoma cells into type I interferon-releasing cellular antitumor vaccines. *Oncoimmunology*, **8**, e1570779.
- Bell, R.A.V. & Megeney, L.A. (2017) Evolution of caspase-mediated cell death and differentiation: Twins separated at birth. *Cell Death Differ.*, **24**, 1359–1368.
- Benjamini, Y. & Hochberg, Y. (1995) Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J. R. Stat. Soc. Ser. B*, **57**, 289–300.
- Besch, R., Poeck, H., Hohenauer, T., Senft, D., Häcker, G., Berking, C., Hornung, V., Endres, S., Ruzicka, T., Rothenfusser, S., & Hartmann, G. (2009) Proapoptotic signaling induced by RIG-I and MDA-5 results in type I interferon-independent apoptosis in human melanoma cells. *J. Clin. Invest.*, **119**, 2399–2411.
- Blanco-Melo, D., Nilsson-Payant, B.E., Liu, W.C., Uhl, S., Hoagland, D., Möller, R., Jordan, T.X., Oishi, K., Panis, M., Sachs, D., Wang, T.T., Schwartz, R.E., Lim, J.K., Albrecht, R.A., & tenOever, B.R. (2020) Imbalanced Host Response to SARS-CoV-2 Drives Development of COVID-19. *Cell*, **181**, 1036–1045.e9.
- Bonfert, T., Kirner, E., Csaba, G., Zimmer, R., & Friedel, C.C. (2015) ContextMap 2: fast and accurate context-based RNA-seq mapping. *BMC Bioinformatics*, **16**, 122.
- Broz, P. & Dixit, V.M. (2016) Inflammasomes: Mechanism of assembly, regulation and signalling. *Nat. Rev. Immunol.*, **16**, 407–420.
- Burke, J.M., Moon, S.L., Matheny, T., & Parker, R. (2019) RNase L reprograms translation by widespread mRNA turnover escaped by antiviral mRNAs. *Mol. Cell*, **75**, 1203–1217.e5.
- Cadena, C. & Hur, S. (2019) Filament-like assemblies of intracellular nucleic acid sensors: Commonalities and differences. *Mol. Cell*, **76**, 243–254.
- Castelli, J.C., Hassel, B.A., Maran, A., Paranjape, J., Hewitt, J.A., Li, X., Hsu, Y.-T., Silverman, R.H., & Youle, R.J. (1998) The role of 2'-5' oligoadenylate-activated ribonuclease L in apoptosis. *Cell Death Differ.*, **5**, 313–320.

- Chakrabarti, A., Jha, B.K., & Silverman, R.H. (2011) New insights into the role of RNase L in innate immunity. *J. Interf. Cytokine Res.*, **31**, 49–57.
- Chattopadhyay, S., Kuzmanovic, T., Zhang, Y., Wetzel, J.L., & Sen, G.C. (2016) Ubiquitination of the transcription factor IRF-3 activates RIPA, the apoptotic pathway that protects mice from viral pathogenesis. *Immunity*, **44**, 1151–1161.
- Chattopadhyay, S., Marques, J.T., Yamashita, M., Peters, K.L., Smith, K., Desai, A., Williams, B.R.G., & Sen, G.C. (2010) Viral apoptosis is induced by IRF-3-mediated activation of Bax. *EMBO J.*, **29**, 1762–1773.
- Chattopadhyay, S. & Sen, G.C. (2017) RIG-I-like receptor-induced IRF3 mediated pathway of apoptosis (RIPA): a new antiviral pathway. *Protein Cell*, **8**, 165–168.
- Chonghaile, T.N., Sarosiek, K.A., Vo, T.T., Ryan, J.A., Tammareddi, A., Moore, V.D.G., Deng, J., Anderson, K.C., Richardson, P., Tai, Y.T., Mitsiades, C.S., Matulonis, U.A., Drapkin, R., Stone, R., DeAngelo, D.J., McConkey, D.J., Sallan, S.E., Silverman, L., Hirsch, M.S., Carrasco, D.R., & Letai, A. (2011) Pretreatment mitochondrial priming correlates with clinical response to cytotoxic chemotherapy. *Science*, **334**, 1129–1133.
- Chow, K.T. & Gale, M. (2015) SnapShot: Interferon signaling. *Cell*, **163**, 1808–1808.e1.
- Chung, H., Calis, J.J.A., Wu, X., Sun, T., Yu, Y., Sarbanes, S.L., Dao Thi, V.L., Shilvock, A.R., Hoffmann, H.-H., Rosenberg, B.R., & Rice, C.M. (2018) Human ADAR1 prevents endogenous RNA from triggering translational shutdown. *Cell*, **172**, 811–824.e14.
- Clemens, M.J. & Williams, B.R.G. (1978) Inhibition of cell-free protein synthesis by pppA2' p5' A2' p5' A: a novel oligonucleotide synthesized by interferon-treated L cell extracts. *Cell*, **13**, 565–572.
- Coll, N.S., Eppele, P., & Dangl, J.L. (2011) Programmed cell death in the plant immune system. *Cell Death Differ.*, **18**, 1247–1256.
- Cong, L., Ran, F.A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., Hsu, P.D., Wu, X., Jiang, W., Marraffini, L. a, & Zhang, F. (2013) Multiplex genome engineering Using CRISPR/Cas systems. *Science*, **339**, 819–823.
- Conradt, B. & Horvitz, H.R. (1998) The *C. elegans* Protein EGL-1 is required for programmed cell death and interacts with the Bcl-2-like protein CED-9. *Cell*, **93**, 519–529.
- Cox, J., Hein, M.Y., Luber, C.A., Paron, I., Nagaraj, N., & Mann, M. (2014) Accurate proteome-wide label-free quantification by delayed normalization and maximal peptide ratio extraction, termed MaxLFQ. *Mol. Cell. Proteomics*, **13**, 2513–2526.
- Daffis, S., Szretter, K.J., Schriewer, J., Li, J., Youn, S., Errett, J., Lin, T.-Y., Schneller, S., Zust, R., Dong, H., Thiel, V., Sen, G.C., Fensterl, V., Klimstra, W.B., Pierson, T.C., Buller, R.M., Gale Jr, M., Shi, P.-Y., & Diamond, M.S. (2010) 2'-O methylation of the viral mRNA cap evades host restriction by IFIT family members. *Nature*, **468**, 452–456.
- Decroly, E., Ferron, F., Lescar, J., & Canard, B. (2011) Conventional and unconventional mechanisms for capping viral mRNA. *Nat. Rev. Microbiol.*, **10**, 51–65.
- Degterev, A. & Yuan, J. (2008) Expansion and evolution of cell death programmes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **9**, 378–390.
- Desai, N., Neyaz, A., Szabolcs, A., Shih, A.R., Chen, J.H., Thapar, V., Nieman, L.T., Solovyov, A., Mehta, A., Lieb, D.J., Kulkarni, A.S., Jaicks, C., Xu, K.H., Raabe, M.J., Pinto, C.J., Juric, D., Chebib, I., Colvin, R.B., Kim, A.Y., Monroe, R., Warren, S.E., Danaher, P., Reeves, J.W., Gong, J., Rueckert, E.H., Greenbaum, B.D., Hacohen, N., Lagana, S.M., Rivera, M.N., Sholl, L.M., Stone, J.R., Ting, D.T., & Deshpande, V. (2020) Temporal and spatial heterogeneity of host response to SARS-CoV-2 pulmonary infection. *Nat. Commun.*, **11**, 6319.
- Dong, B. & Silverman, R.H. (1997) A Bipartite Model of 2-5A-dependent RNase L. *J. Biol. Chem.*, **272**, 22236–22242.
- Donovan, J., Dufner, M., & Korennykh, A. (2013) Structural basis for cytosolic double-stranded RNA surveillance by human oligoadenylate synthetase 1. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **110**, 1652–1657.
- Donovan, J., Rath, S., Kolet-Mandrikov, D., & Korennykh, A. (2017) Rapid RNase L-driven arrest of protein synthesis in the dsRNA response without degradation of translation machinery. *RNA*, **23**, 1660–1671.
- Donovan, J., Whitney, G., Rath, S., & Korennykh, A. (2015) Structural mechanism of sensing long dsRNA via a noncatalytic domain in human oligoadenylate synthetase 3. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **112**, 3949–3954.
- Duewell, P., Beller, E., Kirchleitner, S. V, Adunka, T., Bourhis, H., Siveke, J., Mayr, D., Kobold, S., Endres, S., & Schnurr, M. (2015) Targeted activation of melanoma differentiation-associated protein 5 (MDA5) for immunotherapy of pancreatic carcinoma. *Oncoimmunology*, **4**, e1029698.
- Duewell, P., Steger, A., Lohr, H., Bourhis, H., Hoelz, H., Kirchleitner, S. V, Stieg, M.R., Grassmann, S., Kobold, S., Siveke, J.T., Endres, S., & Schnurr, M. (2014) RIG-I-like helicases induce immunogenic

- cell death of pancreatic cancer cells and sensitize tumors toward killing by CD8⁺ T cells. *Cell Death Differ.*, **21**, 1825–1837.
- Edelmann, F.T., Niedner, A., & Niessing, D. (2014) Production of pure and functional RNA for in vitro reconstitution experiments. *Methods*, **65**, 333–341.
- El Maadidi, S., Faletti, L., Berg, B., Wenzl, C., Wieland, K., Chen, Z.J., Maurer, U., & Borner, C. (2014) A novel mitochondrial MAVS/Caspase-8 platform links RNA virus-induced innate antiviral signaling to Bax/Bak-independent apoptosis. *J. Immunol.*, **192**, 1171–1183.
- Elion, D.L., Jacobson, M.E., Hicks, D.J., Rahman, B., Sanchez, V., Gonzales-Ericsson, P.I., Fedorova, O., Pyle, A.M., Wilson, J.T., & Cook, R.S. (2018) Therapeutically active RIG-I agonist induces immunogenic tumor cell killing in breast cancers. *Cancer Res.*, **78**, 6183–6195.
- Ellermeier, J., Wei, J., Duewell, P., Hoves, S., Stieg, M.R., Adunka, T., Noerenberg, D., Anders, H.J., Mayr, D., Poeck, H., Hartmann, G., Endres, S., & Schnurr, M. (2013) Therapeutic efficacy of bifunctional siRNA combining TGF- β 1 silencing with RIG-I activation in pancreatic cancer. *Cancer Res.*, **73**, 1709–1720.
- Ellis, H.M. & Horvitz, H.R. (1986) Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*. *Cell*, **44**, 817–829.
- Elmore, S. (2007) Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicol. Pathol.*, **35**, 495–516.
- Engelberg-Kulka, H., Amitai, S., Kolodkin-Gal, I., & Hazan, R. (2006) Bacterial programmed cell death and multicellular behavior in bacteria. *PLoS Genet.*, **2**, e135.
- Feng, Q., Hato, S. V., Langereis, M.A., Zoll, J., Virgen-Slane, R., Peisley, A., Hur, S., Semler, B.L., van Rij, R.P., & van Kuppeveld, F.J.M. (2012) MDA5 detects the double-stranded RNA replicative form in picornavirus-infected Cells. *Cell Rep.*, **2**, 1187–1196.
- Fitzgerald, K.A. & Kagan, J.C. (2020) Toll-like receptors and the control of immunity. *Cell*, **180**, 1044–1066.
- Franchi, L., Eigenbrod, T., Muñoz-Planillo, R., Ozkurede, U., Kim, Y.-G., Chakrabarti, A., Gale, M., Silverman, R.H., Colonna, M., Akira, S., & Núñez, G. (2014) Cytosolic double-stranded RNA activates the NLRP3 inflammasome via MAVS-induced membrane permeabilization and K⁺ efflux. *J. Immunol.*, **193**, 4214–4222.
- Galluzzi, L., Buqué, A., Kepp, O., Zitvogel, L., & Kroemer, G. (2017) Immunogenic cell death in cancer and infectious disease. *Nat. Rev. Immunol.*, **17**, 97–111.
- Galluzzi, L., Vitale, I., Aaronson, S.A., Abrams, J.M., Adam, D., Agostinis, P., Alnemri, E.S., Altucci, L., Amelio, I., Andrews, D.W., Annicchiarico-Petruzzelli, M., Antonov, A. V., Arama, E., Baehrecke, E.H., Barlev, N.A., Bazan, N.G., Bernassola, F., Bertrand, M.J.M., Bianchi, K., Blagosklonny, M. V., Blomgren, K., Borner, C., Boya, P., Brenner, C., Campanella, M., Candi, E., Carmona-Gutierrez, D., Cecconi, F., Chan, F.K.-M., Chandel, N.S., Cheng, E.H., Chipuk, J.E., Cidlowski, J.A., Ciechanover, A., Cohen, G.M., Conrad, M., Cubillos-Ruiz, J.R., Czabotar, P.E., D'Angiolella, V., Dawson, T.M., Dawson, V.L., De Laurenzi, V., De Maria, R., Debatin, K.-M., DeBerardinis, R.J., Deshmukh, M., Di Daniele, N., Di Virgilio, F., Dixit, V.M., Dixon, S.J., Duckett, C.S., Dynlacht, B.D., El-Deiry, W.S., Elrod, J.W., Fimia, G.M., Fulda, S., García-Sáez, A.J., Garg, A.D., Garrido, C., Gavathiotis, E., Golstein, P., Gottlieb, E., Green, D.R., Greene, L.A., Gronemeyer, H., Gross, A., Hajnoczky, G., Hardwick, J.M., Harris, I.S., Hengartner, M.O., Hetz, C., Ichijo, H., Jäättelä, M., Joseph, B., Jost, P.J., Juin, P.P., Kaiser, W.J., Karin, M., Kaufmann, T., Kepp, O., Kimchi, A., Kitsis, R.N., Klionsky, D.J., Knight, R.A., Kumar, S., Lee, S.W., Lemasters, J.J., Levine, B., Linkermann, A., Lipton, S.A., Lockshin, R.A., López-Otín, C., Lowe, S.W., Luedde, T., Lugli, E., MacFarlane, M., Madeo, F., Malewicz, M., Malorni, W., Manic, G., Marine, J.-C., Martin, S.J., Martinou, J.-C., Medema, J.P., Mehlen, P., Meier, P., Melino, S., Miao, E.A., Molkentin, J.D., Moll, U.M., Muñoz-Pinedo, C., Nagata, S., Nuñez, G., Oberst, A., Oren, M., Overholtzer, M., Pagano, M., Panaretakis, T., Pasparakis, M., Penninger, J.M., Pereira, D.M., Pervaiz, S., Peter, M.E., Piacentini, M., Pinton, P., Prehn, J.H.M., Puthalakath, H., Rabinovich, G.A., Rehm, M., Rizzuto, R., Rodrigues, C.M.P., Rubinsztein, D.C., Rudel, T., Ryan, K.M., Sayan, E., Scorrano, L., Shao, F., Shi, Y., Silke, J., Simon, H.-U., Sistigu, A., Stockwell, B.R., Strasser, A., Szabadkai, G., Tait, S.W.G., Tang, D., Tavernarakis, N., Thorburn, A., Tsujimoto, Y., Turk, B., Vanden Berghe, T., Vandenabeele, P., Vander Heiden, M.G., Villunger, A., Virgin, H.W., Vousden, K.H., Vucic, D., Wagner, E.F., Walczak, H., Wallach, D., Wang, Y., Wells, J.A., Wood, W., Yuan, J., Zakeri, Z., Zhivotovsky, B., Zitvogel, L., Melino, G., & Kroemer, G. (2018) Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ.*, **25**, 486–541.
- Galluzzi, L., Vitale, I., Abrams, J.M., Alnemri, E.S., Baehrecke, E.H., Blagosklonny, M. V., Dawson, T.M., Dawson, V.L., El-Deiry, W.S., Fulda, S., Gottlieb, E., Green, D.R., Hengartner, M.O., Kepp, O., Knight, R. a, Kumar, S., Lipton, S. a, Lu, X., Madeo, F., Malorni, W., Mehlen, P., Nuñez, G., Peter, M.E., Piacentini, M., Rubinsztein, D.C., Shi, Y., Simon, H.-U., Vandenabeele, P., White, E., Yuan, J., Zhivotovsky, B., Melino, G., & Kroemer, G. (2012) Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ.*, **19**, 107–

- 120.
- Giampazolias, E., Zunino, B., Dhayade, S., Bock, F., Cloix, C., Cao, K., Roca, A., Lopez, J., Ichim, G., Proïcs, E., Rubio-Patiño, C., Fort, L., Yatim, N., Woodham, E., Orozco, S., Taraborrelli, L., Peltzer, N., Lecis, D., Machesky, L., Walczak, H., Albert, M.L., Milling, S., Oberst, A., Ricci, J.E., Ryan, K.M., Blyth, K., & Tait, S.W.G. (2017) Mitochondrial permeabilization engages NF- κ B-dependent anti-tumour activity under caspase deficiency. *Nat. Cell Biol.*, **19**, 1116–1129.
- Glas, M., Coch, C., Trageser, D., Daßler, J., Simon, M., Koch, P., Mertens, J., Quandel, T., Gorris, R., Reinartz, R., Wieland, A., Von Lehe, M., Pusch, A., Roy, K., Schlee, M., Neumann, H., Fimmers, R., Herrlinger, U., Brüstle, O., Hartmann, G., Besch, R., & Scheffler, B. (2013) Targeting the cytosolic innate immune receptors RIG-I and MDA5 effectively counteracts cancer cell heterogeneity in glioblastoma. *Stem Cells*, **31**, 1064–1074.
- Gorbalenya, A.E., Baker, S.C., Baric, R.S., de Groot, R.J., Drosten, C., Gulyaeva, A.A., Haagmans, B.L., Lauber, C., Leontovich, A.M., Neuman, B.W., Penzar, D., Perlman, S., Poon, L.L.M., Samborskiy, D. V., Sidorov, I.A., Sola, I., & Ziebuhr, J. (2020) The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nat. Microbiol.*, **5**, 536–544.
- Goubau, D., Schlee, M., Deddouche, S., Pruijssers, A.J., Zillinger, T., Goldeck, M., Schuberth, C., Van der Veen, A.G., Fujimura, T., Rehwinkel, J., Iskarpatyoti, J. a., Barchet, W., Ludwig, J., Dermody, T.S., Hartmann, G., & Reis e Sousa, C. (2014) Antiviral immunity via RIG-I-mediated recognition of RNA bearing 5'-diphosphates. *Nature*, **514**, 372–375.
- Green, D.R. & Fitzgerald, P. (2016) Just So Stories about the Evolution of Apoptosis. *Curr. Biol.*, **26**, R620–R627.
- Greulich, W., Wagner, M., Gaidt, M.M., Stafford, C., Cheng, Y., Linder, A., Carell, T., & Hornung, V. (2019) TLR8 Is a sensor of RNase T2 degradation products. *Cell*, **179**, 1264-1275.e13.
- Habjan, M., Hubel, P., Lacerda, L., Benda, C., Holze, C., Eberl, C.H., Mann, A., Kindler, E., Gil-Cruz, C., Ziebuhr, J., Thiel, V., & Pichlmair, A. (2013) Sequestration by IFIT1 impairs translation of 2'-O-unmethylated capped RNA. *PLoS Pathog.*, **9**, e1003663.
- Hadjadj, J., Yatim, N., Barnabei, L., Corneau, A., Boussier, J., Smith, N., Péré, H., Charbit, B., Bondet, V., Chenevier-Gobeaux, C., Breillat, P., Carlier, N., Gauzit, R., Morbieu, C., Pène, F., Marin, N., Roche, N., Szwebel, T.-A., Merklings, S.H., Treluyer, J.-M., Veyer, D., Mouthon, L., Blanc, C., Tharaux, P.-L., Rozenberg, F., Fischer, A., Duffy, D., Rieux-Laucat, F., Kernéis, S., & Terrier, B. (2020) Impaired type I interferon activity and inflammatory responses in severe COVID-19 patients. *Science*, **369**, 718–724.
- Han, Y., Donovan, J., Rath, S., Whitney, G., Chitrakar, A., & Korennykh, A. (2014) Structure of human RNase L reveals the basis for regulated RNA decay in the IFN response. *Science*, **343**, 1244–1248.
- Hartmann, G. (2017) Nucleic Acid Immunity. In *Advances in Immunology*, 1st edn. Elsevier Inc., pp. 121–169.
- Heidegger, S., Kreppel, D., Bscheider, M., Stritzke, F., Nedelko, T., Wintges, A., Bek, S., Fischer, J.C., Graalmann, T., Kalinke, U., Bassermann, F., Haas, T., & Poeck, H. (2019) RIG-I activating immunostimulatory RNA boosts the efficacy of anticancer vaccines and synergizes with immune checkpoint blockade. *EBioMedicine*, **41**, 146-155.
- Heidegger, S., Wintges, A., Stritzke, F., Bek, S., Steiger, K., Koenig, P.-A., Göttert, S., Engleitner, T., Öllinger, R., Nedelko, T., Fischer, J.C., Makarov, V., Winter, C., Rad, R., van den Brink, M.R.M., Ruland, J., Bassermann, F., Chan, T.A., Haas, T., & Poeck, H. (2019) RIG-I activation is critical for responsiveness to checkpoint blockade. *Sci. Immunol.*, **4**, eaau8943.
- Heinz, L.X., Lee, J.E., Kapoor, U., Kartnig, F., Sedlyarov, V., Papakostas, K., César-Razquin, A., Essletzbichler, P., Goldmann, U., Stefanovic, A., Bigenzahn, J.W., Scorzoni, S., Pizzagalli, M.D., Bensimon, A., Müller, A.C., King, F.J., Li, J., Girardi, E., Mbow, M.L., Whitehurst, C.E., Rebsamen, M., & Superti-Furga, G. (2020) TASL is the SLC15A4-associated adaptor for IRF5 activation by TLR7–9. *Nature*, **581**, 316–322.
- Helms, M.W., Jahn-Hofmann, K., Gnerlich, F., Metz-Weidmann, C., Braun, M., Dietert, G., Scherer, P., Grandien, K., Theilhaber, J., Cao, H., Wagenaar, T.R., Schnurr, M.M., Endres, S., Wiederschain, D., Scheidler, S., Rothenfußer, S., Brunner, B., & König, L.M. (2019) Utility of the RIG-I Agonist Triphosphate RNA for Melanoma Therapy. *Mol. Cancer Ther.*, **18**, 2343–2356.
- Hengartner, M.O. (2000) The biochemistry of apoptosis. *Nature*, **407**, 770–776.
- Hornung, V., Ellegast, J., Kim, S., Brzózka, K., Jung, A., Kato, H., Poeck, H., Akira, S., Conzelmann, K.-K., Schlee, M., Endres, S., & Hartmann, G. (2006) 5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I. *Science*, **314**, 994–997.
- Hornung, V., Hartmann, R., Ablasser, A., & Hopfner, K.P. (2014) OAS proteins and cGAS: Unifying concepts in sensing and responding to cytosolic nucleic acids. *Nat. Rev. Immunol.*, **14**, 521–528.
- Hovanessian A.G., Brown, R.E., & Kerr, I.M. (1977) Synthesis of low molecular weight inhibitor of protein

- synthesis with enzyme from interferon-treated cells. *Nature*, **268**, 537–540.
- Hughes, C.S., Moggridge, S., Müller, T., Sorensen, P.H., Morin, G.B., & Krijgsvelde, J. (2019) Single-pot, solid-phase-enhanced sample preparation for proteomics experiments. *Nat. Protoc.*, **14**, 68–85.
- Hur, S. (2019) Double-stranded RNA sensors and modulators in innate immunity. *Annu. Rev. Immunol.*, **37**, 349–375.
- Ibsen, M.S., Gad, H.H., Andersen, L.L., Hornung, V., Julkunen, I., Sarkar, S.N., & Hartmann, R. (2015) Structural and functional analysis reveals that human OASL binds dsRNA to enhance RIG-I signaling. *Nucleic Acids Res.*, **43**, 5236–5248.
- Ishizuka, J.J., Manguso, R.T., Cheruiyot, C.K., Bi, K., Panda, A., Iracheta-Vellve, A., Miller, B.C., Du, P.P., Yates, K.B., Dubrot, J., Buchumenski, I., Comstock, D.E., Brown, F.D., Ayer, A., Kohnle, I.C., Pope, H.W., Zimmer, M.D., Sen, D.R., Lane-Reticker, S.K., Robitschek, E.J., Griffin, G.K., Collins, N.B., Long, A.H., Doench, J.G., Kozono, D., Levanon, E.Y., & Haining, W.N. (2019) Loss of ADAR1 in tumours overcomes resistance to immune checkpoint blockade. *Nature*, **565**, 43–48.
- Ivashkiv, L.B. & Donlin, L.T. (2014) Regulation of type I interferon responses. *Nat. Rev. Immunol.*, **14**, 36–49.
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J.A., & Charpentier, E. (2012) A Programmable Dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, **337**, 816–821.
- Kagan, J.C., Magupalli, V.G., & Wu, H. (2014) SMOCs: Supramolecular organizing centres that control innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.*, **14**, 821–826.
- Kato, H., Takeuchi, O., Mikamo-Satoh, E., Hirai, R., Kawai, T., Matsushita, K., Hiiragi, A., Dermody, T.S., Fujita, T., & Akira, S. (2008) Length-dependent recognition of double-stranded ribonucleic acids by retinoic acid-inducible gene-I and melanoma differentiation-associated gene 5. *J. Exp. Med.*, **205**, 1601–1610.
- Kato, H., Takeuchi, O., Sato, S., Yoneyama, M., Yamamoto, M., Matsui, K., Uematsu, S., Jung, A., Kawai, T., Ishii, K.J., Yamaguchi, O., Otsu, K., Tsujimura, T., Koh, C.-S., Reis e Sousa, C., Matsuura, Y., Fujita, T., & Akira, S. (2006) Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. *Nature*, **441**, 101–105.
- Kerr, J.F.R. (2002) History of the events leading to the formulation of the apoptosis concept. *Toxicology*, **181–182**, 471–474.
- Kerr, J.F.R., Wyllie, A.H., & Currie, A.R. (1972) Apoptosis: A basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer*, **26**, 239–257.
- Kluge, M. & Friedel, C.C. (2018) Watchdog – a workflow management system for the distributed analysis of large-scale experimental data. *BMC Bioinformatics*, **19**, 97.
- Kouwaki, T., Nishimura, T., Wang, G., Nakagawa, R., & Oshiumi, H. (2020) Riplet ubiquitin ligase regulates innate antiviral immune responses via lysine 63-linked polyubiquitination of RIG-I and LGP2 and is essential for protection against SARS-CoV-2. *SSRN Electron. J.*, .
- Kübler, K., Gehrke, N., Riemann, S., Böhnert, V., Zillinger, T., Hartmann, E., Pölcher, M., Rudlowski, C., Kuhn, W., Hartmann, G., & Barchet, W. (2010) Targeted Activation of RNA Helicase Retinoic Acid-Inducible Gene-I Induces Proimmunogenic Apoptosis of Human Ovarian Cancer Cells. *Cancer Res.*, **70**, 5293–5304.
- Kumar, P., Sweeney, T.R., Skabkin, M.A., Skabkina, O. V., Hellen, C.U.T., & Pestova, T. V. (2014) Inhibition of translation by IFIT family members is determined by their ability to interact selectively with the 5'-terminal regions of cap0-, cap1- and 5'ppp- mRNAs. *Nucleic Acids Res.*, **42**, 3228–3245.
- Kumar, S., Ingle, H., Mishra, S., Mahla, R.S., Kumar, A., Kawai, T., Akira, S., Takaoka, A., Raut, A.A., & Kumar, H. (2015) IPS-1 differentially induces TRAIL, BCL2, BIRC3 and PRKCE in type I interferons-dependent and -independent anticancer activity. *Cell Death Dis.*, **6**, e1758–e1758.
- Lee, J., Lee, Y., Xu, L., White, R., & Sullenger, B.A. (2017) Differential induction of immunogenic cell death and interferon expression in cancer cells by structured ssRNAs. *Mol. Ther.*, **25**, 1295–1305.
- Lee, J.S., Park, S., Jeong, H.W., Ahn, J.Y., Choi, S.J., Lee, H., Choi, B., Nam, S.K., Sa, M., Kwon, J.-S., Jeong, S.J., Lee, H.K., Park, S.H., Park, S.-H., Choi, J.Y., Kim, S.-H., Jung, I., & Shin, E.-C. (2020) Immunophenotyping of COVID-19 and influenza highlights the role of type I interferons in development of severe COVID-19. *Sci. Immunol.*, **5**.
- Leonard, J.N., Ghirlando, R., Askins, J., Bell, J.K., Margulies, D.H., Davies, D.R., & Segal, D.M. (2008) The TLR3 signaling complex forms by cooperative receptor dimerization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **105**, 258–263.
- Levin, D. & London, I.M. (1978) Regulation of protein synthesis: activation by double-stranded RNA of a protein kinase that phosphorylates eukaryotic initiation factor 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **75**, 1121–1125.

- Li, G., Xiang, Y., Sabapathy, K., & Silverman, R.H. (2004) An apoptotic signaling pathway in the interferon antiviral response mediated by RNase L and c-Jun NH 2-terminal kinase, *J. Biol. Chem.*, **279**, 1123–1131.
- Li, H. & Durbin, R. (2009) Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics*, **25**, 1754–1760.
- Li, Y., Banerjee, S., Goldstein, S.A., Dong, B., Gaughan, C., Rath, S., Donovan, J., Korennykh, A., Silverman, R.H., & Weiss, S.R. (2017) Ribonuclease I mediates the cell-lethal phenotype of double-stranded RNA editing enzyme ADAR1 deficiency in a human cell line. *Elife*, **6**, 1–18.
- Li, Y., Banerjee, S., Wang, Y., Goldstein, S.A., Dong, B., Gaughan, C., Silverman, R.H., & Weiss, S.R. (2016) Activation of RNase L is dependent on OAS3 expression during infection with diverse human viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **113**, 2241–2246.
- Liao, Y., Smyth, G.K., & Shi, W. (2014) featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics*, **30**, 923–930.
- Linkermann, A. & Green, D.R. (2014) Necroptosis. *N. Engl. J. Med.*, **370**, 455–465.
- Liu, G.Q. & Gack, M.U. (2020) Distinct and orchestrated functions of rna sensors in innate immunity. *Immunity*, **53**, 26–42.
- Liu, H., Golji, J., Brodeur, L.K., Chung, F.S., Chen, J.T., DeBeaumont, R.S., Bullock, C.P., Jones, M.D., Kerr, G., Li, L., Rakiec, D.P., Schlabach, M.R., Sovath, S., Gowney, J.D., Pagliarini, R.A., Ruddy, D.A., MacIsaac, K.D., Korn, J.M., & McDonald, E.R. (2019) Tumor-derived IFN triggers chronic pathway agonism and sensitivity to ADAR loss. *Nat. Med.*, **25**, 95–102.
- Liu, L., Botos, I., Wang, Y., Leonard, J.N., Shiloach, J., Segal, D.M., & Davies, D.R. (2008) Structural basis of toll-like receptor 3 signaling with double-stranded RNA. *Science*, **320**, 379–381.
- Lucas, C., Wong, P., Klein, J., Castro, T.B.R., Silva, J., Sundaram, M., Ellingson, M.K., Mao, T., Oh, J.E., Israelow, B., Takahashi, T., Tokuyama, M., Lu, P., Venkataraman, A., Park, A., Mohanty, S., Wang, H., Wyllie, A.L., Vogels, C.B.F., Earnest, R., Lapidus, S., Ott, I.M., Moore, A.J., Muenker, M.C., Fournier, J.B., Campbell, M., Odio, C.D., Casanovas-Massana, A., Obaid, A., Lu-Culligan, A., Nelson, A., Brito, A., Nunez, A., Martin, A., Watkins, A., Geng, B., Kalinich, C., Harden, C., Todeasa, C., Jensen, C., Kim, D., McDonald, D., Shepard, D., Courchaine, E., White, E.B., Song, E., Silva, E., Kudo, E., Deluili, G., Rahming, H., Park, H.J., Matos, I., Nouws, J., Valdez, J., Fauver, J., Lim, J., Rose, K.A., Anastasio, K., Brower, K., Glick, L., Sharma, L., Sewanan, L., Knaggs, L., Minasyan, M., Batsu, M., Petrone, M., Kuang, M., Nakahata, M., Campbell, M., Linehan, M., Askenase, M.H., Simonov, M., Smolgovsky, M., Sonner, N., Naushad, N., Vijayakumar, P., Martinello, R., Datta, R., Handoko, R., Bermejo, S., Prophet, S., Bickerton, S., Velazquez, S., Alpert, T., Rice, T., Khoury-Hanold, W., Peng, X., Yang, Y., Cao, Y., Strong, Y., Herbst, R., Shaw, A.C., Medzhitov, R., Schulz, W.L., Grubaugh, N.D., Dela Cruz, C., Farhadian, S., Ko, A.I., Omer, S.B., & Iwasaki, A. (2020) Longitudinal analyses reveal immunological misfiring in severe COVID-19. *Nature*, **584**, 463–469.
- Malathi, K., Dong, B., Gale, M., & Silverman, R.H. (2007) Small self-RNA generated by RNase L amplifies antiviral innate immunity. *Nature*, **448**, 816–819.
- Mali, P., Esvelt, K.M., & Church, G.M. (2013) Cas9 as a versatile tool for engineering biology. *Nat. Methods*, **10**, 957–963.
- Manivannan, P., Siddiqui, M.A., & Malathi, K. (2020) RNase L amplifies interferon signaling by inducing protein kinase R-mediated antiviral stress granules. *J. Virol.*, **94**, 1–21.
- Matsushima-Miyagi, T., Hatano, K., Nomura, M., Li-Wen, L., Nishikawa, T., Saga, K., Shimbo, T., & Kaneda, Y. (2012) TRAIL and Noxa are selectively upregulated in prostate cancer cells downstream of the RIG-I/MAVS signaling pathway by nonreplicating Sendai virus particles. *Clin. Cancer Res.*, **18**, 6271–6283.
- McAllister, C.S. & Samuel, C.E. (2009) The RNA-activated protein kinase enhances the induction of interferon- β and apoptosis mediated by cytoplasmic RNA sensors. *J. Biol. Chem.*, **284**, 1644–1651.
- Medzhitov, R. (2007) Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature*, **449**, 819–826.
- Mehta, P., McAuley, D.F., Brown, M., Sanchez, E., Tattersall, R.S., & Manson, J.J. (2020) COVID-19: consider cytokine storm syndromes and immunosuppression. *Lancet*, **395**, 1033–1034.
- Meng, H., Deo, S., Xiong, S., Dzananovic, E., Donald, L.J., van Dijk, C.W., & McKenna, S.A. (2012) Regulation of the interferon-inducible 2'-5'-oligoadenylate synthetases by adenovirus VA I RNA. *J. Mol. Biol.*, **422**, 635–649.
- Minks, M.A., West, D.K., Benveniste, S., & Baglioni, C. (1979) Structural requirements of double-stranded RNA for the activation of 2',5'-oligo(A) polymerase and protein kinase of interferon-treated HeLa cells. *J. Biol. Chem.*, **254**, 10180–10183.
- Nakajima, A., Nishimura, K., Nakaima, Y., Oh, T., Noguchi, S., Taniguchi, T., & Tamura, T. (2009) Cell type-dependent proapoptotic role of Bcl2L12 revealed by a mutation concomitant with the disruption of the

- juxtaposed Irf3 gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **106**, 12448–12452.
- Nallagatla, S.R., Hwang, J., Toroney, R., Zheng, X., Cameron, C.E., & Bevilacqua, P.C. (2007) 5'-triphosphate-dependent activation of PKR by RNAs with short stem-loops. *Science*, **318**, 1455–1458.
- Ning, X., Wang, Y., Jing, M., Sha, M., Lv, M., Gao, P., Zhang, R., Huang, X., Feng, J.M., & Jiang, Z. (2019) Apoptotic caspases suppress type I interferon production via the cleavage of cGAS, MAVS, and IRF3. *Mol. Cell*, **74**, 19-31.e7.
- Oshiumi, H., Okamoto, M., Fujii, K., Kawanishi, T., Matsumoto, M., Koike, S., & Seya, T. (2011) The TLR3/TICAM-1 pathway is mandatory for innate immune responses to Poliovirus infection. *J. Immunol.*, **187**, 5320–5327.
- Ostendorf, T., Zillinger, T., Andryka, K., Schlee-Guimaraes, T.M., Schmitz, S., Marx, S., Bayrak, K., Linke, R., Salgert, S., Wegner, J., Grasser, T., Bauersachs, S., Soltesz, L., Hübner, M.P., Nastaly, M., Coch, C., Kettwig, M., Roehl, I., Henneke, M., Hoerauf, A., Barchet, W., Gärtner, J., Schlee, M., Hartmann, G., & Bartok, E. (2020) Immune sensing of synthetic, bacterial, and protozoan RNA by Toll-like receptor 8 requires coordinated processing by RNase T2 and RNase 2. *Immunity*, **52**, 591-605.e6.
- Pairo-Castineira, E., Clohisey, S., Klaric, L., Bretherick, A.D., Rawlik, K., Pasko, D., Walker, S., Parkinson, N., Fourman, M.H., Russell, C.D., Furniss, J., Richmond, A., Gountouna, E., Wrobel, N., Harrison, D., Wang, B., Wu, Y., Meynert, A., Griffiths, F., Oosthuyzen, W., Kousathanas, A., Moutsianas, L., Yang, Z., Zhai, R., Zheng, C., Grimes, G., Beale, R., Millar, J., Shih, B., Keating, S., Zechner, M., Haley, C., Porteous, D.J., Hayward, C., Yang, J., Knight, J., Summers, C., Shankar-Hari, M., Klenerman, P., Turtle, L., Ho, A., Moore, S.C., Hinds, C., Horby, P., Nichol, A., Maslove, D., Ling, L., McAuley, D., Montgomery, H., Walsh, T., Pereira, A., Renieri, A., Shen, X., Ponting, C.P., Fawkes, A., Tenesa, A., Caulfield, M., Scott, R., Rowan, K., Murphy, L., Openshaw, P.J.M., Semple, M.G., Law, A., Vitart, V., Wilson, J.F., & Baillie, J.K. (2020) Genetic mechanisms of critical illness in Covid-19. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-03065-y>
- Pichlmair, A., Lassnig, C., Eberle, C.-A., Górna, M.W., Baumann, C.L., Burkard, T.R., Bürckstümmer, T., Stefanovic, A., Krieger, S., Bennett, K.L., Rülcke, T., Weber, F., Colinge, J., Müller, M., & Superti-Furga, G. (2011) IFIT1 is an antiviral protein that recognizes 5'-triphosphate RNA. *Nat. Immunol.*, **12**, 624–630.
- Pichlmair, A., Schulz, O., Tan, C.-P., Rehwinkel, J., Kato, H., Takeuchi, O., Akira, S., Way, M., Schiavo, G., & Reis e Sousa, C. (2009) Activation of MDA5 Requires Higher-Order RNA Structures Generated during Virus Infection. *J. Virol.*, **83**, 10761–10769.
- Platanias, L.C. (2005) Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling. *Nat. Rev. Immunol.*, **5**, 375–386.
- Poeck, H., Besch, R., Maihoefer, C., Renn, M., Tormo, D., Morskaya, S.S., Kirschnek, S., Gaffal, E., Landsberg, J., Hellmuth, J., Schmidt, A., Anz, D., Bscheider, M., Schwerdt, T., Berking, C., Bourquin, C., Kalinke, U., Kremmer, E., Kato, H., Akira, S., Meyers, R., Häcker, G., Neuenhahn, M., Busch, D., Ruland, J., Rothenfusser, S., Prinz, M., Hornung, V., Endres, S., Tüting, T., & Hartmann, G. (2008) 5'-triphosphate-siRNA: Turning gene silencing and Rig-I activation against melanoma. *Nat. Med.*, **14**, 1256–1263.
- Ramirez, M.L.G. & Salvesen, G.S. (2018) A primer on caspase mechanisms. *Semin. Cell Dev. Biol.*, **82**, 79–85.
- Ran, F.A., Hsu, P.D., Wright, J., Agarwala, V., Scott, D.A., & Zhang, F. (2013) Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat. Protoc.*, **8**, 2281–2308.
- Rath, S., Prangle, E., Donovan, J., Demarest, K., Wingreen, N.S., Meir, Y., & Korennykh, A. (2019) Concerted 2-5A-mediated mRNA decay and transcription reprogram protein synthesis in the dsRNA response. *Mol. Cell*, **75**, 1218-1228.e6.
- Reece, S.E., Pollitt, L.C., Colegrave, N., & Gardner, A. (2011) The meaning of death: Evolution and ecology of apoptosis in protozoan parasites. *PLoS Pathog.*, **7**, e1002320.
- Ritchie, M.E., Phipson, B., Wu, D., Hu, Y., Law, C.W., Shi, W., & Smyth, G.K. (2015) limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res.*, **43**, e47–e47.
- Rongvaux, A., Jackson, R., Harman, C.C.D., Li, T., West, A.P., De Zoete, M.R., Wu, Y., Yordy, B., Lakhani, S.A., Kuan, C.Y., Taniguchi, T., Shadel, G.S., Chen, Z.J., Iwasaki, A., & Flavell, R.A. (2014) Apoptotic caspases prevent the induction of type I interferons by mitochondrial DNA. *Cell*, **159**, 1563–1577.
- Rothan, H.A. & Byrareddy, S.N. (2020) The epidemiology and pathogenesis of coronavirus disease (COVID-19) outbreak. *J. Autoimmun.*, **109**, 102433.
- Ruzicka, M., Koenig, L.M., Formisano, S., Boehmer, D.F.R., Vick, B., Heuer, E.-M., Meinl, H., Kocheise, L., Zeitlhofer, M., Ahlfeld, J., Kobold, S., Endres, S., Subklewe, M., Duewell, P., Schnurr, M., Jeremias, I., Lichtenegger, F.S., & Rothenfusser, S. (2020) RIG-I-based immunotherapy enhances survival in

- preclinical AML models and sensitizes AML cells to checkpoint blockade. *Leukemia*, **34**, 1017–1026.
- Ryan, J.A., Brunelle, J.K., & Letai, A. (2010) Heightened mitochondrial priming is the basis for apoptotic hypersensitivity of CD4⁺ CD8⁺ thymocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **107**, 12895–12900.
- Sato, M., Suemori, H., Hata, N., Asagiri, M., Ogasawara, K., Nakao, K., Nakaya, T., Katsuki, M., Noguchi, S., Tanaka, N., & Taniguchi, T. (2000) Distinct and essential roles of transcription factors IRF-3 and IRF-7 in response to viruses for IFN- α/β Gene induction. *Immunity*, **13**, 539–548.
- Schlee, M. & Hartmann, G. (2016) Discriminating self from non-self in nucleic acid sensing. *Nat. Rev. Immunol.*, **16**, 566–580.
- Schlee, M., Roth, A., Hornung, V., Hagmann, C.A., Wimmenauer, V., Barchet, W., Coch, C., Janke, M., Mihailovic, A., Wardle, G., Juraneck, S., Kato, H., Kawai, T., Poeck, H., Fitzgerald, K. a., Takeuchi, O., Akira, S., Tuschl, T., Latz, E., Ludwig, J., & Hartmann, G. (2009) Recognition of 5' triphosphate by RIG-I helicase requires short blunt double-stranded RNA as contained in panhandle of negative-strand virus. *Immunity*, **31**, 25–34.
- Schmid-Burgk, J.L., Schmidt, T., Gaidt, M.M., Pelka, K., Latz, E., Ebert, T.S., & Hornung, V. (2014) OutKnocker: a web tool for rapid and simple genotyping of designer nuclease edited cell lines. *Genome Res.*, **24**, 1719–1723.
- Schmidt, A., Schwerdt, T., Hamm, W., Hellmuth, J.C., Cui, S., Wenzel, M., Hoffmann, F.S., Michallet, M.-C., Besch, R., Hopfner, K.-P., Endres, S., & Rothenfusser, S. (2009) 5'-triphosphate RNA requires base-paired structures to activate antiviral signaling via RIG-I. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **106**, 12067–12072.
- Schneider, W.M., Chevillotte, M.D., & Rice, C.M. (2014) Interferon-stimulated genes: A complex web of host defenses. *Annu. Rev. Immunol.*, **32**, 513–545.
- Secombes, C.J. & Zou, J. (2017) Evolution of interferons and interferon receptors. *Front. Immunol.*, **8**, 2–11.
- Singh, R., Letai, A., & Sarosiek, K. (2019) Regulation of apoptosis in health and disease: the balancing act of BCL-2 family proteins. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **20**, 175–193.
- Slaymaker, I.M., Gao, L., Zetsche, B., Scott, D.A., Yan, W.X., & Zhang, F. (2016) Rationally engineered Cas9 nucleases with improved specificity. *Science*, **351**, 84–88.
- Sommerey, C., Paul, S., Staeheli, P., & Michiels, T. (2008) IFN-Lambda (IFN- λ) is expressed in a tissue-dependent fashion and primarily acts on epithelial cells in vivo. *PLoS Pathog.*, **4**, e1000017.
- Stawowczyk, M., Van Scoy, S., Kumar, K.P., & Reich, N.C. (2011) The interferon stimulated gene 54 promotes apoptosis. *J. Biol. Chem.*, **286**, 7257–7266.
- Stojdl, D.F., Lichty, B.D., TenOever, B.R., Paterson, J.M., Power, A.T., Knowles, S., Marius, R., Reynard, J., Poliquin, L., Atkins, H., Brown, E.G., Durbin, R.K., Durbin, J.E., Hiscott, J., & Bell, J.C. (2003) VSV strains with defects in their ability to shutdown innate immunity are potent systemic anti-cancer agents. *Cancer Cell*, **4**, 263–275.
- Strasser, A. & Vaux, D.L. (2018) Viewing BCL2 and cell death control from an evolutionary perspective. *Cell Death Differ.*, **25**, 13–20.
- Strich, R. (2015) Programmed cell death initiation and execution in budding yeast. *Genetics*, **200**, 1003–1014.
- Such, L., Zhao, F., Liu, D., Thier, B., Khanh Le-Trilling, V.T., Sucker, A., Coch, C., Pieper, N., Howe, S., Bhat, H., Kalkavan, H., Ritter, C., Brinkhaus, R., Ugurel, S., Köster, J., Seifert, U., Dittmer, U., Schuler, M., Lang, K.S., Kufer, T.A., Hartmann, G., Becker, J.C., Horn, S., Ferrone, S., Liu, D., van Allen, E.M., Schadendorf, D., Griewank, K., Trilling, M., & Paschen, A. (2020) Targeting the innate immunoreceptor RIG-I overcomes melanoma-intrinsic resistance to T cell immunotherapy. *J. Clin. Invest.*, **140**, 4266–4281.
- Tait, S.W.G. & Green, D.R. (2008) Caspase-independent cell death: Leaving the set without the final cut. *Oncogene*, **27**, 6452–6461.
- Tait, S.W.G., Ichim, G., & Green, D.R. (2014) Die another way - non-apoptotic mechanisms of cell death. *J. Cell Sci.*, **127**, 2135–2144.
- Tormo, D., Chęcińska, A., Alonso-Curbelo, D., Pérez-Guijarro, E., Cañón, E., Riveiro-Falkenbach, E., Calvo, T.G., Larribere, L., Megías, D., Mulero, F., Piris, M. a., Dash, R., Barral, P.M., Rodríguez-Peralto, J.L., Ortiz-Romero, P., Tüting, T., Fisher, P.B., & Soengas, M.S. (2009) Targeted activation of innate immunity for therapeutic induction of autophagy and apoptosis in melanoma cells. *Cancer Cell*, **16**, 103–114.
- Vachon, V.K., Calderon, B.M., & Conn, G.L. (2015) A novel RNA molecular signature for activation of 2'-5' oligoadenylate synthetase-1. *Nucleic Acids Res.*, **43**, 544–552.
- Van Opdenbosch, N. & Lamkanfi, M. (2019) Caspases in cell death, inflammation, and disease. *Immunity*, **50**, 1352–1364.

- Vaux, D., Weissman, I., & Kim, S. (1992) Prevention of programmed cell death in *Caenorhabditis elegans* by human bcl-2. *Science*, **258**, 1955–1957.
- Vaux, D.L., Haecker, G., & Strasser, A. (1994) An evolutionary perspective on apoptosis. *Cell*, **76**, 777–779.
- Wenzel, M., Wunderlich, M., Besch, R., Poeck, H., Willms, S., Schwantes, A., Kremer, M., Sutter, G., Endres, S., Schmidt, A., & Rothenfusser, S. (2012) Cytosolic DNA triggers mitochondrial apoptosis via DNA damage signaling proteins independently of AIM2 and RNA polymerase III. *J. Immunol.*, **188**, 394–403.
- White, M.J., McArthur, K., Metcalf, D., Lane, R.M., Cambier, J.C., Herold, M.J., van Delft, M.F., Bedoui, S., Lessene, G., Ritchie, M.E., Huang, D.C.S., & Kile, B.T. (2014) Apoptotic caspases suppress mtDNA-induced STING-mediated type I IFN production. *Cell*, **159**, 1549–1562.
- Wu, J. & Chen, Z.J. (2014) Innate immune sensing and signaling of cytosolic nucleic acids. *Annu. Rev. Immunol.*, **32**, 461–488.
- Yamamoto, M., Sato, S., Hemmi, H., Hoshino, K., Kaisho, T., Sanjo, H., Takeuchi, O., Sugiyama, M., Okabe, M., Takeda, K., & Akira, S. (2003) Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science*, **301**, 640–643.
- Yanai, H., Chiba, S., Hangai, S., Kometani, K., Inoue, A., Kimura, Y., Abe, T., Kiyonari, H., Nishio, J., Taguchi-Atarashi, N., Mizushima, Y., Negishi, H., Grosschedl, R., & Taniguchi, T. (2018) Revisiting the role of IRF3 in inflammation and immunity by conditional and specifically targeted gene ablation in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **115**, 5253–5258.
- Yao, H., Rice, C.M., Correspondence, S.H., Dittmann, M., Peisley, A., Hoffmann, H.-H., Gilmore, R.H., Schmidt, T., Schmid-Burgk, J.L., Hornung, V., & Hur, S. (2015) ATP-dependent effector-like functions of RIG-I-like receptors. *Mol. Cell*, **58**, 1–8.
- Yoneyama, M., Kikuchi, M., Natsukawa, T., Shinobu, N., Imaizumi, T., Miyagishi, M., Taira, K., Akira, S., & Fujita, T. (2004) The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nat. Immunol.*, **5**, 730–737.
- Youle, R.J. & Strasser, A. (2008) The BCL-2 protein family: Opposing activities that mediate cell death. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **9**, 47–59.
- Yu, G., Wang, L.-G., Han, Y., & He, Q.-Y. (2012) clusterProfiler: an R Package for comparing biological themes among gene clusters. *Omi. A J. Integr. Biol.*, **16**, 284–287.
- Zhang, Q., Bastard, P., Liu, Z., Le Pen, J., Moncada-Velez, M., Chen, J., Ogishi, M., Sabli, I.K.D., Hodeib, S., Korol, C., Rosain, J., Bilguvar, K., Ye, J., Bolze, A., Bigio, B., Yang, R., Arias, A.A., Zhou, Q., Zhang, Y., Onodi, F., Korniotis, S., Karpf, L., Philippot, Q., Chbihi, M., Bonnet-Madin, L., Dorgham, K., Smith, N., Schneider, W.M., Razoosky, B.S., Hoffmann, H.-H., Michailidis, E., Moens, L., Han, J.E., Lorenzo, L., Bizien, L., Meade, P., Neehus, A.-L., Ugurbil, A.C., Corneau, A., Kerner, G., Zhang, P., Rapaport, F., Seeleuthner, Y., Manry, J., Masson, C., Schmitt, Y., Schlüter, A., Le Voyer, T., Khan, T., Li, J., Fellay, J., Roussel, L., Shahrooei, M., Alosaimi, M.F., Mansouri, D., Al-Saud, H., Al-Mulla, F., Almourfi, F., Al-Muhsen, S.Z., Alshime, F., Al Turki, S., Hasanato, R., van de Beek, D., Biondi, A., Bettini, L.R., D'Angio, M., Bonfanti, P., Imberti, L., Sottini, A., Paghera, S., Quiros-Roldan, E., Rossi, C., Oler, A.J., Tompkins, M.F., Alba, C., Vandernoot, I., Goffard, J.-C., Smits, G., Migeotte, I., Haerynck, F., Soler-Palacin, P., Martin-Nalda, A., Colobran, R., Morange, P.-E., Keles, S., Çölkese, F., Özcelik, T., Yasar, K.K., Senoglu, S., Karabela, Ş.N., Rodríguez-Gallego, C., Novelli, G., Hraiech, S., Tandjaoui-Lambiotte, Y., Duval, X., Laouénan, C., COVID-STORM Clinicians, COVID Clinicians, Imagine COVID Group, French COVID Cohort Study Group, CoV-Contact Cohort, Amsterdam UMC Covid-19 Biobank, COVID Human Genetic Effort, NIAID-USUHS/TAGC COVID Immunity Group, Snow, A.L., Dalgard, C.L., Milner, J.D., Vinh, D.C., Mogensen, T.H., Marr, N., Spaan, A.N., Boisson, B., Boisson-Dupuis, S., Bustamante, J., Puel, A., Ciancanelli, M.J., Meyts, I., Maniatis, T., Soumelis, V., Amara, A., Nussenzweig, M., García-Sastre, A., Krammer, F., Pujol, A., Duffy, D., Lifton, R.P., Zhang, S.-Y., Gorocho, G., Béziat, V., Jouanguy, E., Sancho-Shimizu, V., Rice, C.M., Abel, L., Notarangelo, L.D., Cobat, A., Su, H.C., & Casanova, J.-L. (2020) Inborn errors of type I IFN immunity in patients with life-threatening COVID-19. *Science*, **370**.
- Zhou, A. (1993) Expression cloning of 2'-5A-dependent RNAase: A uniquely regulated mediator of interferon action. *Cell*, **72**, 753–765.
- Zhou, A. (1997) Interferon action and apoptosis are defective in mice devoid of 2',5'-oligoadenylate-dependent RNase L. *EMBO J.*, **16**, 6355–6363.
- Zhu, J., Zhang, Y., Ghosh, A., Cuevas, R.A., Forero, A., Dhar, J., Ibsen, M.S., Schmid-Burgk, J.L., Schmidt, T., Ganapathiraju, M.K., Fujita, T., Hartmann, R., Barik, S., Hornung, V., Coyne, C.B., & Sarkar, S.N. (2014) Antiviral activity of human OASL protein is mediated by enhancing signaling of the RIG-I RNA sensor. *Immunity*, **40**, 936–948.
- Zierhut, C., Yamaguchi, N., Paredes, M., Luo, J.-D., Carroll, T., & Funabiki, H. (2019) The cytoplasmic DNA sensor cGAS promotes mitotic cell death. *Cell*, **178**, 302-315.e23.

- Zilberstein, A., Kimchi, A., Schmidt, A., & Revel, M. (1978) Isolation of two interferon-induced translational inhibitors: a protein kinase and an oligo-isoadenylate synthetase. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **75**, 4734–4738.
- Zou, J., Kawai, T., Tsuchida, T., Kozaki, T., Tanaka, H., Shin, K.S., Kumar, H., & Akira, S. (2013) Poly I:C triggers a cathepsin D- and IPS-1-dependent pathway to enhance cytokine production and mediate dendritic cell necroptosis. *Immunity*, **38**, 717–728.

7. Verzeichnis der Abkürzungen und Akronyme

2-5A	2'-5'-Oligoadenylat
2CARD	<i>Tandem caspase activation and recruitment domain</i>
3p-RNA	5'-Triphosphat-RNA
ACN	Acetonitril
ADAR1	<i>Double-stranded RNA-specific adenosine deaminase</i>
ANOVA	<i>Analysis of variance</i> , Varianzanalyse
APAF1	<i>Apoptotic protease activating factor-1</i>
APC	Allophycocyanin
ARDS	<i>Acute respiratory distress syndrome</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BAK	<i>Bcl-2 homologous antagonist/killer</i>
BAX	<i>Bcl-2-associated X protein</i>
bp	Basenpaare
BCL2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BCL2-L12	<i>Bcl-2-like protein 12</i>
BCL-xL	<i>Bcl-2-like protein 1</i>
BD	Becton, Dickinson and Company
BH3	<i>Bcl-2 homology domain 3</i>
BID	<i>BH3 interacting-domain death agonist</i>
BIM	<i>Bcl-2-like protein 11</i>
BIRC3	<i>Baculoviral IAP repeat-containing protein 3</i>
BOK	<i>Bcl-2 related ovarian killer</i>
BSA	Bovines Serum-Albumin
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
CARD	<i>Caspase activation and recruitment domain</i>
cDNA	<i>copy-Desoxyribonukleinsäure</i>
cGAS	<i>cyclic GMP-AMP synthase</i>
COVID-19	<i>Coronavirus disease 2019</i>
CTB	CellTiter-Blue
CTD	C-terminale Domäne
CRISPR	<i>Clustered regularly interspaced short palindromic repeats</i>
CXCL10	<i>C-X-C motif chemokine 10</i>
DAMP	<i>Danger-associated molecular pattern</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
eIF2 α	Eukaryotischer Translationsinitiationsfaktor 2 α
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>

ER	Endoplasmatisches Retikulum
FastAP	<i>FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase</i>
FC	<i>fold change</i>
FITC	Fluorescein
FVD	<i>Fixable viability dye eFluor 780</i>
GAS	IFN- γ -activated site
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
GO: MF	<i>Gene ontology molecular funktion</i>
HMGB1	<i>High-Mobility-Group-Protein B1</i>
HPLC	<i>High Pressure Liquid Chromatography</i>
h	Stunde(n)
IFN	Interferon
IFN- α	IFN- α 2a
IL	Interleukin
IFNAR	IFN-alpha/beta-Rezeptor
IFNGR	IFN-gamma-Rezeptor
IFIT	<i>Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats</i>
IFNLR1	IFN-lambda Rezeptor 1, Interleukin 28 receptor, alpha subunit
IKK ϵ	<i>Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit epsilon</i>
IRAK	<i>Interleukin-1 receptor-associated kinase</i>
IRF	<i>IFN regulatory factor</i>
ISG	Interferon-stimuliertes Gen
ISGF3	<i>IFN-gene stimulated factor 3</i>
ISRE	<i>IFN-stimulated response elements</i>
IVT	<i>In vitro</i> -Transkription
JAK	Januskinase
KO	Knockout
LC-MS	Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung
LFQ	Markierungsfreie Quantifizierung
LGP2	<i>Laboratory of genetics and physiology 2</i>
LPS	Lipopolysaccharid
mM	milimolar
MAMP	<i>Microorganism-associated molecular patterns</i>
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MAP3K7	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 7</i>
MAVS	<i>Mitochondrial antiviral signaling protein</i>
MCL1	<i>Induced myeloid leukemia cell differentiation protein Mcl-1</i>
MDA5	<i>Melanoma differentiation-associated protein 5</i>

MEFs	<i>Mouse embryonic fibroblasts</i>
MFI	Mediane Fluoreszenzintensität
MHC	Major histocompatibility complex
Min	Minute(n)
MOI	<i>Multiplicity of infection</i>
MOMP	<i>Mitochondrial outer membrane permeabilization</i>
mRNA	Messenger RNA
MS	Massenspektrometrie
MYD88	<i>Myeloid differentiation primary response 88</i>
NF- κ B	<i>Nuclear factor kappa B</i>
NGS	<i>Next generation sequencing</i>
NHEJ	<i>Non-homologous end-joining</i>
NLRP	<i>NACHT, LRR and PYD domains-containing protein</i>
Noxa	<i>Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1</i>
NP-40	Nonidet P40
OAS	<i>Oligoadenylate synthetase</i>
PAMP	<i>Pathogen-associated molecular pattern</i>
PBS	Phosphate-buffered saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PE	Phycoerithrin
PKR	<i>Double-stranded RNA-activated protein kinase R</i>
Poly (dA:dT)	<i>Polydeoxyadenylic:deoxythymidylic acid</i>
Poly (I:C)	<i>Polyinosinic:polycytidylic acid</i>
ppm	<i>Parts per million</i>
PRKCE	<i>Protein kinase C epsilon type</i>
PRR	<i>Pattern-recognition-Rezeptor</i>
PUMA	<i>p53 upregulated modulator of apoptosis</i> oder <i>Bcl-2-binding component 3 (BBC3)</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RIG-I	<i>Retinoic acid-inducible gene I</i>
RIPA	<i>RLR-induced IRF-3-mediated pathway of apoptosis</i>
RIPK1	<i>Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1</i>
RLRs	<i>RIG-I-like-Rezeptoren</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNA-seq	RNA-Sequenzierung
RNase L	<i>2-5A-dependent ribonuclease</i>
rpm	<i>rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde(n)
SARS-CoV-2	<i>Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2</i>

SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SEM	Standardfehler
sgRNA	<i>single-guide-RNA</i>
shRNA	<i>short hairpin RNA</i>
siRNA	<i>short interfering RNA</i>
SMOC	<i>Supramolecular organizing center</i>
ss	Einzelsträngig
STAT	<i>Signal transducer and activator of transcription</i>
STING	<i>Stimulator of interferon genes</i>
TASL	<i>TLR adaptor interacting with SLC15A4 on the lysosome</i>
TBK1	<i>TANK-binding kinase 1</i>
TLR	<i>Toll-like</i> Rezeptor
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TRAIL	<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>
TRIF	<i>TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β</i>
TYK2	<i>Tyrosine kinase 2</i>
U	<i>Unit(s)</i>
USP18	<i>Ubiquitin specific peptidase 18</i>
VA RNA	<i>Viral associated RNA</i>
Vol.	Volumen
VSV	<i>Vesicular Stomatitis Indiana Virus</i>

8. Danksagung





Ich danke meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Max Schnurr für die Aufnahme in die Arbeitsgruppe, die Überlassung des Themas und die vielen Ratschläge und Unterstützung in allen Lebenslagen. Besonderer Dank gilt Dr. Lars König und PD Dr. Peter Düwell für die Betreuung, die fantastische Anleitung zum wissenschaftlichen Arbeiten und die enge Freundschaft.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Stefan Endres für die Aufnahme in die Abteilung für Klinische Pharmakologie, die einzigartige Atmosphäre, die er in der Abteilung geschaffen hat, und die großartige Unterstützung in jeder Hinsicht. Ich danke Herrn Prof. Dr. Simon Rothenfusser für die zahlreichen Ratschläge und Unterstützung.

Ich danke meinem Mitdoktoranden Simone Formisano für die Fortsetzung des Themas und die gute, enge Zusammenarbeit. Ich danke ferner Dr. Stephan A. Müller, Prof. Dr. Stefan Lichtenthaler, Michael Kluge, Prof. Dr. Caroline C. Friedel und Dr. Meino Rohlf für die Durchführung von Massenspektrometrie und RNA-Sequenzierung.

Ich danke meinen Eltern und Sara, ohne die Nichts von dieser Arbeit möglich gewesen wäre.

9. Affidavit

			
Eidesstattliche Versicherung			

Böhmer, Daniel Frederic Richard

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel:

5'-Triphosphat-RNA induziert Tumorzelltod in einer RIG-I-abhängigen priming-Phase
und einer Oligoadenylatsynthetase 1 (OAS1)-RNase L-abhängigen Effektorphase

.....

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

__München, 14.11.2021_____
Ort, Datum

____Daniel Böhmer_____
Unterschrift

10. Wissenschaftliche Beiträge

10.1 Originalarbeiten

1. S. Bek, F. Stritzke, A. Wintges, T. Nedelko, **D. F. R. Böhmer**, J. C. Fischer, T. Haas, H. Poeck, S. Heidegger, Targeting intrinsic RIG-I signaling turns melanoma cells into type I interferon-releasing cellular antitumor vaccines. *Oncoimmunology*. **8**, e1570779 (2019).
2. P. Metzger, S. V. Kirchleitner, M. Kluge, L. M. Koenig, C. Hörth, C. A. Rambuscheck, **D. Böhmer**, J. Ahlfeld, S. Kobold, C. C. Friedel, S. Endres, M. Schnurr, P. Duewell, Immunostimulatory RNA leads to functional reprogramming of myeloid-derived suppressor cells in pancreatic cancer. *J. Immunother. Cancer*. **7**, 288 (2019).
3. M. Ruzicka, L. M. Koenig, S. Formisano, **D. F. R. Boehmer**, B. Vick, E.-M. Heuer, H. Meinl, L. Kocheise, M. Zeitlhöfler, J. Ahlfeld, S. Kobold, S. Endres, M. Subklewe, P. Duewell, M. Schnurr, I. Jeremias, F. S. Lichtenegger, S. Rothenfusser, RIG-I-based immunotherapy enhances survival in preclinical AML models and sensitizes AML cells to checkpoint blockade. *Leukemia*. **34**, 1017–1026 (2020).
4. **D. F. R. Boehmer**, L. M. Koehler, T. Magg, P. Metzger, M. Rohlf, J. Ahlfeld, A. Rack-Hoch, K. Reiter, M. H. Albert, S. Endres, S. Rothenfusser, C. Klein, L. M. Koenig, F. Hauck, A novel complete autosomal-recessive STAT1 LOF variant causes immunodeficiency with hemophagocytic lymphohistiocytosis-like hyperinflammation. *J. Allergy Clin. Immunol. Pract.* **8**, 3102-3111 (2020)
5. **D. F. R. Boehmer**, S. Formisano, S. A. Mueller, M. Kluge, P. Metzger, M. Rohlf, C. Hörth, L. Kocheise, S. F. Lichtenthaler, S. Endres, S. Rothenfusser, C. C. Friedel, P. Duewell, M. Schnurr, and L. M. Koenig, OAS1/RNase L executes 5'-triphosphate RNA-dependent tumor cell apoptosis. Zur Veröffentlichung eingereicht.

10.2 Übersichtsarbeit (*Perspective*)

1. L. M. Koenig, **D. F. R. Boehmer**, P. Metzger, M. Schnurr, S. Endres, S. Rothenfusser, Blocking inflammation on the way: Rationale for CXCR2 antagonists for the treatment of COVID-19. *J. Exp. Med.* **217** (2020), doi:10.1084/jem.20201342.

10.3 Abstracts und Poster (nur Erstautorenschaften)

1. **Böhmer, D.**, Posselt, L., Lazic, I., König, L., Endres, S., Duewell, P., Mayr, D., De Toni, E.N., Rothenfusser, S., Schnurr, M. RIG-I-basierte Immuntherapie des Hepatozellulären Karzinoms. Zeitschrift für Gastroenterologie 53(08), August 2015.
2. **Boehmer, D.**, Koenig, L., Posselt, L., Rothenfusser, S., Duewell, P., Schnurr, M. Characterization of ppp-RNA induced cell death in HCC. Kongressbeitrag TOLL Meeting 2015, Marbella, Spanien.
3. **Boehmer, D.**, Formisano S., Duewell P., Rothenfusser S., Schnurr M., L. M. Koenig. Noncanonical cell death induction by Poly(I:C) independent of RLR. Kongressbeitrag TOLL Meeting 2018, Porto, Portugal.

4. **Boehmer D.**, Formisano S., Duewell P., Kluge M., Mueller S., Friedel C., Rohlf s M., Lichtenthaler S., Rothenfusser S., Hornung V., Endres S., Schnurr M. and Koenig L. M. Double-stranded RNA triggers cell death through an RLR-dependent priming and an RLR-independent effector phase. Kongressbeitrag II Joint Meeting of the German Society for Immunology and the Italian Society of Immunology, Clinical Immunology and Allergology (48th Annual Meeting of the German Society for Immunology) 2019, München, Deutschland.